

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Kropáčková

Post-translační modifikace tubulinu
Tubulin post-translational modifications

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 5. 2018

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Cyrilovi Bařinkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl. Za trpělivost a pomoc při psaní práce bych dále ráda poděkovala Ing. Zsófii Kutil, Ph.D. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu.

Abstrakt

Mikrotubuly složené z heterodimerů $\alpha\beta$ -tubulinu jsou nedílnou součástí buněčného cytoskeletu eukaryotických organismů. Podílejí se na transportu, který v buňce probíhá, určují rozmístění membránových organel a utvářejí buněčnou polaritu. Dále jsou součástí dynamických struktur, jako je například dělicí vřeténko, ale tvoří také stabilní struktury, jako jsou axonemy bičků a cilií. Mikrotubuly tedy v buňkách a tkáních zastávají mnoho odlišných funkcí a musí se proto od sebe nějakým způsobem odlišovat. Právě post-translační modifikace molekul $\alpha\beta$ -tubulinu v mikrotubulech jsou zdrojem jejich diverzity a definují tzv. „tubulinový kód“. Doposud bylo identifikováno dvanáct post-translačních modifikací tubulinu/mikrotubulů. Rozluštění mechanismů, jakými k post-translačním modifikacím tubulinu/mikrotubulů dochází, včetně identifikace odpovědných enzymů, je důležitým zdrojem porozumění dopadu těchto modifikací na biologické funkce.

Klíčová slova: tubulin, post-translační modifikace, mikrotubuly, acetylace, tyrosinace, polyaminace, polyglutamylace

Abstract

Microtubules composed of $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers are an integral part of the cellular cytoskeleton of eukaryotic organisms. They participate in the cellular transport, determine the distribution of membrane organelles and help defining cellular polarity. Microtubules are part of dynamic structures such as mitotic spindle, but they also form stable structures such as flagellar and ciliar axonemes. Microtubules have many distinct functions in cells and tissues and therefore must differ from each other in some way. Post-translational modifications of $\alpha\beta$ -tubulin in microtubules are the major source of their diversity and collectively define so-called tubulin code. Twelve posttranslational modifications of tubulin/microtubules have been identified so far. Unraveling the mechanisms involved in post-translational modifications of tubulin/microtubules, including the identification of responsible enzymes, is an important source of understanding of the effects of these modifications on biological functions.

Key words: tubulin, post-translational modification, microtubules, acetylation, tyrosination, polyamination, polyglutamylation

Obsah

1	Úvod	1
2	Struktura a funkce mikrotubulů	2
3	Post-translační modifikace $\alpha\beta$ -tubulinu	3
3.1	Tyrosinace a detyrosinace α -tubulinu	4
3.1.1	$\Delta 2$ tubulin	5
3.1.2	Enzymy účastnící se tyrosinace a detyrosinace	6
3.1.3	Funkce tyrosinace/detyrosinace tubulinu	7
3.2	Polyglutamylace a polyglycylace $\alpha\beta$ -tubulinu	8
3.2.1	Enzymy účastnící se poly-/de-glutamylace a polyglycylace	9
3.2.2	Funkce polyglutamylace a polyglycylace $\alpha\beta$ -tubulinu	12
3.3	Polyaminace $\alpha\beta$ -tubulinu	13
3.3.1	Transglutaminasa 2 (TG2)	14
3.3.2	Funkce polyaminace $\alpha\beta$ -tubulinu	16
3.4	Acetylace α -tubulinu	17
3.4.1	Tubulinové histonacetyltransferasy a histondeacetylasy	17
3.4.2	Funkce acetylace tubulinu	21
3.4.3	Patofyziologie	22
4	Další post-translační modifikace	23
5	Závěr	28
6	Přehled použité literatury	29

Seznam použitých zkratk

Å	Ångström
ALS	amyotrofická laterální skleróza
α TAT1	alfa-tubulinacetyltransferasa 1
ATP	adenosintrifosfát
BicD2	bicaudal D homolog 2
CCP	cytosolická karboxypeptidasa
Cdk1	cyklin-dependentní kinasa 1
CLIP-170	cytoplasmatic linker protein-170
c-MTBD	kladně nabitá doména vázající mikrotubuly
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB1	end-binding protein 1
ELP3	elongator complex protein 3
FUS	fused in Sarcoma
Gcn5	histone acetyltransferase Gcn5
GDP	guanosindifosfát
GlcNAc	β -N-acetylglukosamin
GTP	guanosintrifosfát
HDAC6	histone deacetylase 6
Hsp90	protein teplotního šoku 90
IGFBP-3	insulin-like growth factor-binding protein-3
IL-10	interleukin 10
Jak2	janus kinase 2

LPS	lipopolysacharidy
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
MAP	proteiny asociující s mikrotubuly
MEC-17	mechanosensory abnormality protein 17
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
p38	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
PGs1	polyglutamylase subunit 1
RNA	ribonukleová kyselina
SETD2	SET domain containing 2
siRNA	small interfering RNA
SIRT2	silent information regulator 2
SOD1	superoxiddismutasa 1
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
SUMO	small ubiquitin-related modifier
SVBP	small vasohibin binding protein
Syk	spleen tyrosine kinase
Tau	tubulin-associated unit
TCP	Tubulinová karboxypeptidasa
TDP-43	Transactive response DNA binding protein
TG2	transglutaminasa 2
TTL	tubulintyrosinligasa
TTLL	tubulin tyrosine-like ligasa
VASH-1	Vasohibin-1

1 Úvod

Mikrotubuly jsou dynamické struktury složené z heterodimerů $\alpha\beta$ -tubulinu, které v buňkách zastávají mnoho odlišných funkcí. Aby se mohly účastnit různých biologických procesů, musí se od sebe navzájem odlišovat. Diverzita mikrotubulů tak probíhá na dvou úrovních. Jedním ze způsobů, jak buňka od sebe navzájem mikrotubuly odlišuje, je produkce rozdílných izotypů α a β -tubulinu. Mikrotubuly jsou v eukaryotických organismech tedy složeny z odlišných izotypů $\alpha\beta$ -tubulinu, které vykazují heterogenitu v sekvenci aminokyselin zejména v C-koncových nestrukturovaných sekvencích monomerů, kde se nachází tzv. izotyp definující regiony. Menší sekvenční odlišnosti se vyskytují i v N-koncové části (Sullivan and Cleveland, 1986). Druhou využívanou možností je tvorba post-translačních modifikací, které se nacházejí jak na volných heterodimerech, tak na dimerech přítomných ve struktuře mikrotubulů (MacRae, 1997).

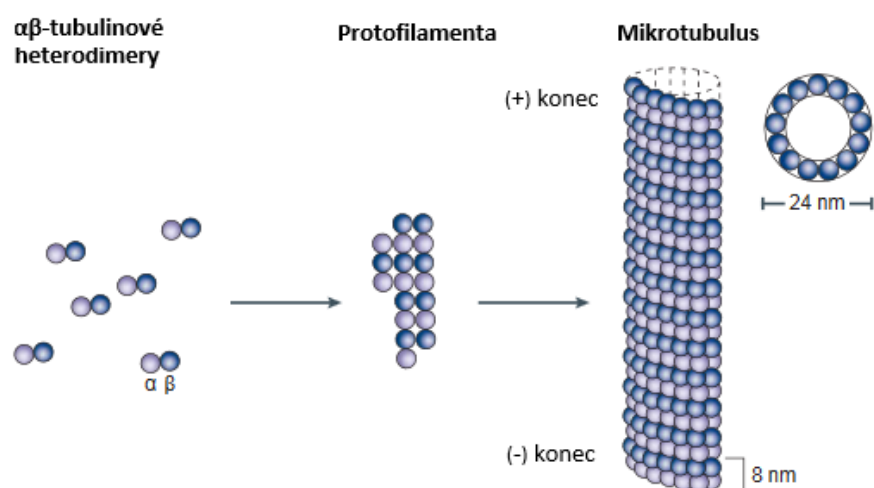
Pomocí post-translačních modifikací jsou upravovány proteiny, které jsou v buňce syntetizovány. Tímto způsobem dochází ke změně stávajících vlastností proteinů a může tak být ovlivněna i buněčná lokalizace a funkce proteinu. Množstvím těchto modifikací prochází právě i tubulin v mikrotubulech, což následně ovlivňuje například jejich stabilitu, interakci s molekulárními motory a s proteiny, které s mikrotubuly asociují za účelem stabilizace nebo naopak destabilizace, či štěpení. První identifikovanou post-translační modifikací tubulinu byla RNA-independentní enzymatická inkorporace tyrosinu (Barra *et al.*, 1973). Od té doby bylo nalezeno mnoho dalších modifikací, které ovlivňují vlastnosti mikrotubulů, i když mnohdy je význam těchto úprav nejasný. Proto se mnoho studií snaží objasnit vliv modifikací tubulinu na funkce mikrotubulů. Tyto znalosti mohou být dále využity také při porozumění patofyziologickým změnám mikrotubulů, které jsou spojené s množstvím lidských onemocnění, zejména s neurodegenerativními poruchami jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc nebo amyotrofická laterální skleróza.

Cílem této bakalářské práce je vytvořit přehled existujících post-translačních modifikací tubulinu a mikrotubulů včetně souvisejících enzymatických procesů. Dále tato bakalářská práce popisuje vliv modifikací na biologické funkce se zaměřením na acetylaci a deacetylaci a na případné patofyziologické jevy související s touto konkrétní modifikací.

2 Struktura a funkce mikrotubulů

Mikrotubuly jsou jednou z hlavních součástí buněčného cytoskeletu u všech eukaryotických organismů. Skládají se z heterodimerů $\alpha\beta$ -tubulinu, které se dále spojují nekovalentními vazbami v lineární protofilamenta. Obvykle třináct protofilament spolu laterálně asociuje a tvoří tak mikrotubuly (obrázek č. 1). Počet protofilament tvořících mikrotubuly se pohybuje od jedenácti do šestnácti a je závislý na buněčném typu. Například podpůrné buňky v savčím vnitřním uchu obsahují mikrotubuly tvořené patnácti protofilamenty (Tucker *et al.*, 1992) a naopak u *Caenorhabditis elegans* je většina mikrotubulů v buňkách tvořena jedenácti protofilamenty (Chalfie and Thomson, 1979).

Mikrotubuly jsou jako součást cytoskeletu využívány k transportu prostřednictvím molekulárních motorů, určují rozmístění membránových organel a utvářejí buněčnou polaritu. Protofilamenta a z nich složené mikrotubuly jsou totiž díky střídání podjednotek $\alpha\beta$ -tubulinu polární, kdy na konci označovaném jako minus-konec [(-) konec] je α -tubulin a na opačném konci nazývaném jako plus-konec [(+) konec] se nachází β -tubulin (viz obrázek č. 1). Mikrotubuly tvoří také dělicí vřeténko, které je nezbytné při buněčném dělení, neboť zajišťuje rovnoměrné rozdělení chromozomů do vznikajících dceřiných buněk. Mikrotubuly jsou dále součástí řasinek a bičíků, a tak se podílí na buněčném pohybu.



Obrázek č. 1: Při vzniku mikrotubulu obvykle asociuje třináct protofilament složených z heterodimerů $\alpha\beta$ -tubulinu. Na (-) konci se nachází α -tubulin a na (+) konci se nachází β -tubulin. Převzato z (Jordan and Wilson, 2004).

Mikrotubuly jsou v buňkách ukotveny svým (-) koncem v organizačním centru v tzv. centrozomu. Pro (+) konec je charakteristická dynamická nestabilita, která spočívá

ve střídavém růstu a zkracování mikrotubulů. Na každý volný heterodimer je navázán GTP, který je po zařazení $\alpha\beta$ -tubulinu do mikrotubulu hydrolyzován na GDP, přičemž se změní konformace tubulinových molekul a jejich vzájemná vazba je slabší. Pokud dochází k polymeraci rychleji než k hydrolyze, tubulinové podjednotky jsou k sobě pevně navázány a vzniká tzv. GTP-čepička, která chrání mikrotubuly před depolymerací. Když ovšem dojde k hydrolyze dříve než k navázání další podjednotky, tak mikrotubuly začnou depolymerovat. U volných heterodimerů je GDP nahrazeno GTP, a tak se můžou zase účastnit polymerace. Stabilitu mikrotubulů regulují také proteiny asociující s mikrotubuly – MAP (microtubule-associated proteins). Například proteiny tau (tubulin-associated unit) a MAP2 (microtubule-associated protein 2) stabilizují mikrotubuly v axonech a dendritických buňkách (Mandelkow and Mandelkow, 1995), naproti tomu protein stathmin způsobuje destabilizaci (Belmont and Mitchison, 1996).

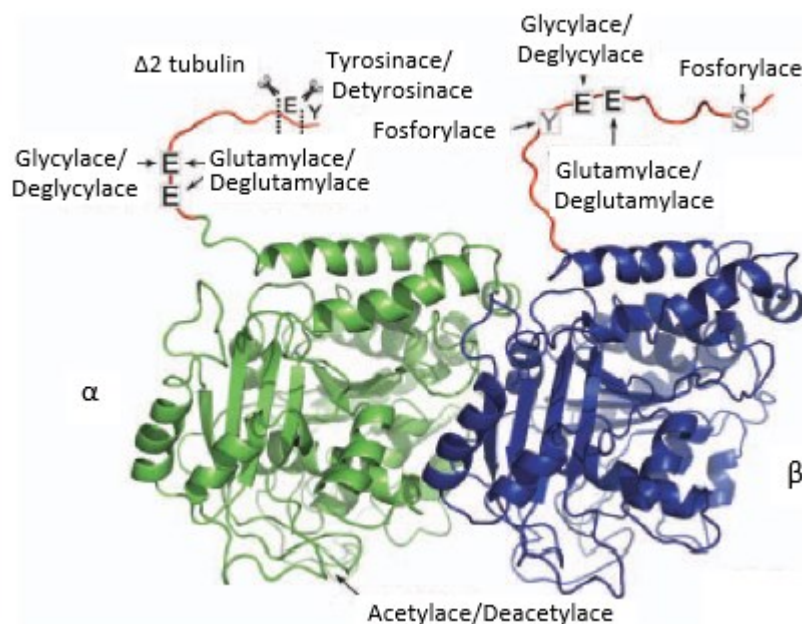
Mikrotubuly v buňkách a tkáních zastávají mnoho odlišných funkcí a musí se od sebe nějakým způsobem odlišovat. Jednou z možností je produkce různých izotypů $\alpha\beta$ -tubulinu v buňce. Izotyp definující regiony, ve kterých se jednotlivé izotypy liší nejvíce, se nacházejí v C-terminálních záporně nabitých nestrukturovaných koncích obou monomerů. Menší sekvenční odlišnosti se vyskytují i v amino-terminální části (Sullivan and Cleveland, 1986). Avšak tento způsob není efektivní u některých nižších eukaryotických organismů, které nesou gen pouze pro jeden izotyp. Proto se na odlišení funkčně rozdílných mikrotubulů dále podílí množství post-translačních modifikací (MacRae, 1997).

3 Post-translační modifikace $\alpha\beta$ -tubulinu

Post-translační modifikace jsou specifické úpravy proteinů, ke kterým dochází po jejich syntéze na ribozomech. Většina těchto modifikací je reverzibilní a má vliv na stabilitu a biologickou funkci proteinů, a také na lokalizaci v buňce. Mikrotubuly podléhají těmto úpravám také, přičemž mohou být modifikovány jak heterodimery samotné, tak i ty obsažené v mikrotubulech.

Většina modifikací probíhá na C-terminálních koncích heterodimerů. Výjimku tvoří acetylace, která je jedinou modifikací realizovanou v lumen mikrotubulu (obrázek č. 2). Mezi post-translační modifikace dále patří detyrosinace, při které dochází

k odštěpení C-terminálního tyrosinu. $\Delta 2$ tubulin představuje modifikaci navazující na detyrosinaci, přičemž je odštěpen předposlední glutamát z C-konce. Polyglutamylace a polyglycylyce umožňují vytvořit na mikrotubulech variabilní délku těchto C-koncových sekvencí. Nedávno byla objevena také polyaminace. Na mikrotubulech dochází k mnoha dalším post-translačním modifikacím, a to k fosforylaci, glykosylaci, palmitoylaci, ubiquitinaci, sumoylaci, methylaci a sukcinylaci (shrnutí v Song and Brady, 2015). V následujících letech se však předpokládá nalezení dalších modifikací.



Obrázek č. 2: Místa post-translačních modifikací heterodimeru $\alpha\beta$ -tubulinu (α -tubulin je zelený, β -tubulin je modrý). Oranžově jsou označeny C-konce obou molekul tubulinu. Je zřejmé, že právě zde se odehrává většina modifikací. Převzato z (Garnham and Roll-Mecak, 2012).

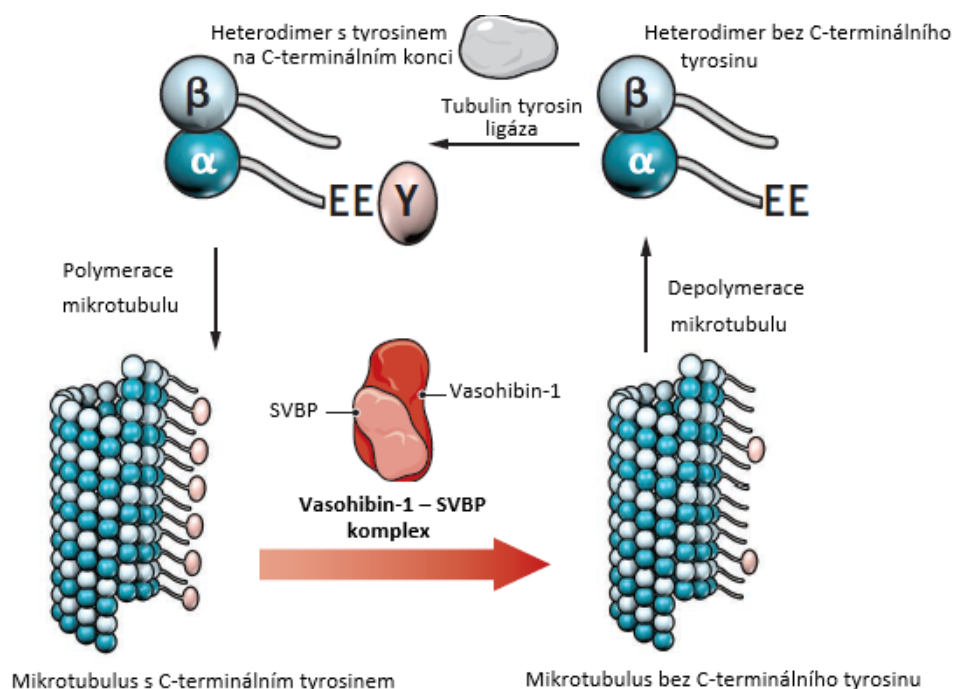
3.1 Tyrosinace a detyrosinace α -tubulinu

U většiny izotypů α -tubulinu se na C-konci vyskytuje tyrosin, který může být reversibilně odštěpen. Někdy se tyto reakce označují jako detyrosinační-tyrosinační tubulinový cyklus. První známou post-translační modifikací tubulinu byla právě tyrosinace. Jedná se o RNA-independentní enzymatickou inkorporaci tyrosinu (Barra *et al.*, 1973), při níž je na C-koncový glutamát α -tubulinu připojen α -peptidovou vazbou tyrosin. Takto modifikovaný tubulin se označuje jako Tyr-tubulin. Detyrosinace je reakcí opačnou, která musí tyrosinaci předcházet, neboť převážná část izotypů obsahuje v DNA sekvenci tyrosin kódovaný před stop kodonem. Produktem reakce je tzv. Glu-tubulin, protože odštěpením tyrosinu se na C-konci odkryje předposlední glutamát (Arce *et al.*, 1975).

Dlouho nebylo známo, který enzym přesně katalyzuje odštěpení C-terminálního tyrosinu. Jako enzym zodpovědný za detyrosinaci byla označována blíže nespecifikovaná karboxypeptidasa (Argaraña *et al.*, 1977) až do roku 2017. Studie z tohoto roku označují za tubulinovou karboxypeptidasu (TCP) regulující detyrosinaci vasohibin-1 (VASH-1) v komplexu s SVBP (Small Vasohibin Binding Protein) [(Nieuwenhuis *et al.*, 2017) (Aillaud *et al.*, 2017)]. Reverzibilní reakci, tedy připojení tyrosinu zpět k tubulinu katalyzuje dobře známá tubulintyrosinligasa (TTL) (obrázek č. 3) patřící do skupiny glutathion-synthetas s ATP-dependentní ligační aktivitou (Galperin and Koonin, 1997). Substrátem pro TTL je samotný heterodimer (Arce *et al.*, 1978), kdežto pro TCP jsou substrátem mikrotubuly (Arce and Barra, 1985). Součástí stabilních struktur mikrotubulů je tedy Glu-tubulin, kdežto Tyr-tubulin se vyskytuje v dynamických strukturách (Webster *et al.*, 1987).

3.1.1 $\Delta 2$ tubulin

$\Delta 2$ tubulin je izotyp tubulinu, který na C-konci α -podjednotky nemá terminální tyrosin a glutamát. Vzniká z detyrosinovaného α -tubulinu, kterému je odštěpen „předposlední“ glutamát na C-konci. Takový tubulin, již není schopen retirosinace a z cyklu tak uniká. Vyskytuje se hlavně v mozkové tkáni (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1991), kde představuje až 35 % tubulinu (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994). Odštěpení glutamátu katalyzují cytosolické karboxypeptidasy (CCP) CCP1-6 [Berezniuk *et al.*, 2012; Tort *et al.*, 2014; Berezniuk *et al.*, 2013; Rogowski *et al.*, 2010]. K retirosinaci nedochází, protože pro navázání TTL na tubulin je nezbytné, aby C-konec obsahoval dva po sobě jdoucí glutamáty (Prota *et al.*, 2013). Odštěpení glutamátu tedy vede k ireverzibilním změnám ve struktuře mikrotubulů a k jejich stabilizaci. Proto se $\Delta 2$ tubulin se stejně jako Glu-tubulin vyskytuje ve stabilních strukturách mikrotubulů v neuronech, bičících a ciliích (Konno, Setou and Ikegami, 2012).



Obrázek č. 3: Detyrosinační-tyrosinační tubulinový cyklus. Heterodimery s C-terminálním tyrosinem polymerují v mikrotubuly. Vasohibin-1 v komplexu s SVBP z mikrotubulů odštěpuje C-terminální tyrosiny. Po depolymeraci je ke vzniklým heterodimerům připojen tyrosin pomocí tubulintyrosinligasy. Převzato z (Akhmanova and Maiato, 2017).

3.1.2 Enzymy účastnící se tyrosinace a detyrosinace

Tubulintyrosinligasa (TTL) je enzym katalyzující tyrosinaci α -tubulinu. Aktivní místo TTL se skládá ze tří domén N-terminální, centrální a C-terminální (obrázek č. 5A). Pro reakci je zde také nezbytná přítomnost ATP a dvou hořečnatých iontů (Szyk *et al.*, 2011). Katalytické domény TTL rozpoznávají heterodimer $\alpha\beta$ -tubulinu jako celek, což může být vysvětlením, proč dochází k reakci pouze na C-terminálním konci α -tubulinové podjednotky. Jedině ona je při interakci s TTL orientována tak, aby mohlo k její tyrosinaci dojít. TTL rozpoznává C-konec α -tubulinu prostřednictvím vodíkových vazeb mezi Glu441 a Glu449 na straně tubulinu a Arg73, Ala75, Ser76, Ser152, Val179 a Asn10, Ser12, Arg44, Pro336 na straně TTL a kotví tak C-konec α -tubulinu v aktivním místě. Z hlediska regulace pomocí fosforylace TTL je důležitý Ser152. Mutace S152E způsobuje téměř úplnou ztrátu enzymové aktivity (Prota *et al.*, 2013).

Jak bylo zmíněno výše, tak jedinou známou tubulinovou karboxypeptidasou (TCP) regulující detyrosinaci je Vasohibin-1 (VASH-1) doposud studovaný spíše v souvislosti s regulací angiogeneze. Nedávno však bylo zjištěno, že v komplexu s SVBP katalyzuje detyrosinaci mikrotubulů. Shodly se na tom dvě nezávislé studie, kdy Aillaud

et al. identifikovali VASH jako enzym zodpovědný za detyrosinaci pomocí silného inhibitoru, kdežto Nieuwenhuis *et al.* použili genetický přístup. Analýzou sekvence bylo zjištěno, že VASH patří do skupiny transglutaminase-like cysteine proteas a obsahuje nekanonickou katalytickou triádu Cys-His-Ser (Sanchez-Pulido and Ponting, 2016). Mutace v této triádě na pozici cysteinu způsobily úplnou ztrátu katalytické aktivity (Aillaud *et al.*, 2017). SVBP se na VASH váže s vysokou afinitou, zvyšuje rozpustnost a sekreci VASH a zabraňuje jeho ubiquitinaci. Jeho funkce je tedy podobná chaperonu (Suzuki *et al.*, 2010). Pokud je VASH v komplexu s SVBP je detyrosinace mikrotubulů mnohem účinnější (Aillaud *et al.*, 2017). Více informací o mechanismu enzymové aktivity v souvislosti s detyrosinací mikrotubulů by mohlo přinést rozluštění krystalové struktury vasohibinu.

3.1.3 Funkce tyrosinace/detyrosinace tubulinu

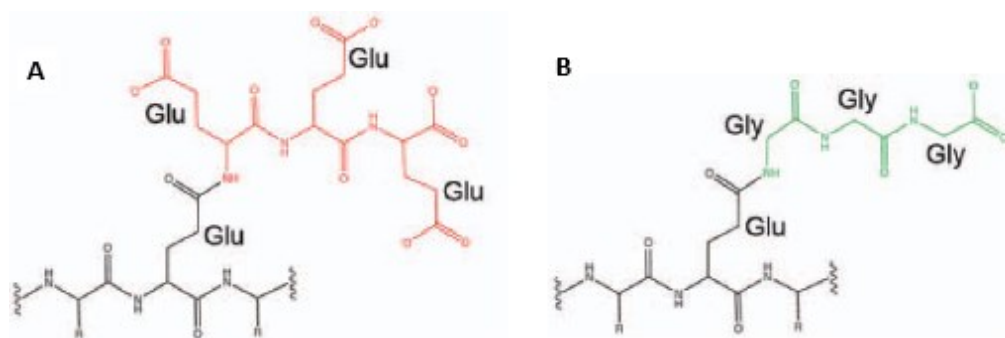
Na molekulární úrovni má tyrosinace/detyrosinace tubulinu vliv na interakce mikrotubulů s mikrofilamenty (Marcos *et al.*, 2009) a intermediálními filamenty (Kreitzer, Liao and Gundersen, 1999) a reguluje také například interakce mikrotubulů s molekulárními motory nebo MAP proteiny. Některé proteiny jako třeba EB1 (end-binding protein 1) a CLIP-170 (cytoplasmatic linker protein-170), které se specificky vážou na (+) konec mikrotubulů vyžadují tyrosinaci α -tubulinu. Protein EB1 rozpoznává a váže se na (+) konec mikrotubulu zcela autonomně, kdežto CLIP-170 se naváže pouze v přítomnosti tyrosinovaného α -tubulinu i EB1 proteinu, oba totiž obsahují shodný C-terminální motiv EEY (Bieling *et al.*, 2008). Tyrosinace tubulinu mění také rychlost pohybu molekulárního motoru dyneinu po mikrotubulech. V této souvislosti byl zkoumán pohyb dyneinu v komplexu s dynaktinem a BicD2 (bicaudal D homolog 2), které umožňují vazbu různých buněčných struktur na dynein. Ukázalo se, že rychlost pohybu dyneinu po Glu-mikrotubulu byla čtyřikrát pomalejší, než po Tyr-mikrotubulech (McKenney *et al.*, 2016). Tyrosinace tubulinu ovlivňuje i pohyb kinesinu-1. Ten se preferenčně pohybuje pouze po axonech, ve kterých je vysoký obsah Glu-mikrotubulů. Jeho přístupu k dendritům je bráněno právě tím, že obsahují převážně mikrotubuly složené z Tyr-tubulinu. Pokud dojde k inhibici TTL, kinesin-1 je schopen se vázat k mikrotubulům axonálním i dendritickým (Konishi and Setou, 2009). Vyšší afinitu kinesinu-1 ke Glu-mikrotubulům potvrdila i *in vitro* studie (Liao and Gundersen, 1998). Dále bylo zjištěno, že se po Glu-mikrotubulu kinesin-1 pohybuje s mnohem nižší rychlostí, než po Tyr-mikrotubulu (Dunn *et al.*, 2008).

Správná funkce TTL je nezbytná pro vývoj a fungování nervové tkáně. Snížená aktivita TTL má negativní vliv na vývoj nervových buněk a také je spojována s progresí nádorů. Myši s inaktivovanou TTL umírají v perinatálním období. Pokud se narodí, zemřou do 24 hodin. Dochází u nich k dramatickým změnám ve struktuře mozku již během prenatálního vývoje, dále mají respirační poruchy a ataxii. Také mají v non-neurálních tkáních zvýšenou expresi $\Delta 2$ tubulinu, avšak bez zjevného důsledku pro vývoj orgánů nebo funkci buněk. U neuronů bez TTL dochází k morfogenetickým anomáliím, které mohou být způsobeny tím, že růstové kony postrádají CLIP-170 (Erck *et al.*, 2005). Fibroblasty postrádající TTL vykazují vady při formování dělicího vřeténka a morfologické změny, které jsou také způsobeny zvýšeným množstvím Glu-tubulinu a chybějícím CLIP-170 (Peris *et al.*, 2006). V nádorových buňkách se hromadí Glu-tubulin, což zřejmě souvisí s potlačením aktivity TTL během růstu nádorů (Lafanechère *et al.*, 1998). Tato selektivní výhoda rakovinných buněk byla pozorována i u pacientek s nádorem prsu. Glu-tubulin se vyskytoval u 53 % sledovaných pacientek a převládal v 19,4 % případů, u nichž byla také sledována vysoká progresie onemocnění (Mialhe *et al.*, 2001). V rakovinných buňkách se nachází množství Glu- a $\Delta 2$ tubulinu, a tím se dají odlišit od buněk normálních. Toho by mohlo být využito při léčbě rakovinných onemocnění (Soucek *et al.*, 2006).

3.2 Polyglutamylace a polyglycylace $\alpha\beta$ -tubulinu

Glutamylace a glycylace jsou post-translační modifikace, při kterých dochází k připojování kyseliny glutamové (Glu) (Eddé *et al.*, 1990) a glycinu (Gly) (Redeker *et al.*, 1994) k C-terminálním koncům α i β -tubulinu (viz obrázek č. 4). Zde je na γ -karboxylovou skupinu glutamátu připojen glutamát nebo glycin prostřednictvím isopeptidové kovalentní vazby. Polyglutamátové a polyglycinové vedlejší řetězce jsou pak tvořeny Glu/Gly, které se připojují amidovou vazbou k α -karboxylové skupině již navázaných Glu/Gly a vzniká tak mezi nimi klasická peptidová vazba (Redeker *et al.*, 1991). Vyhledávaným substrátem pro tyto reakce jsou spíše než samotné heterodimery stabilní struktury mikrotubulů (Audebert *et al.*, 1993). Polyglutamátové vedlejší řetězce mohou obsahovat až 17 glutamátů (Geimer *et al.*, 1997) a vyskytují se hlavně u mikrotubulů v neuronech, kde takto upravený tubulin tvoří 40-50 % tubulinu v mozku. Další struktury obsahující polyglutamylované mikrotubuly jsou centrioly. Pravděpodobně se přes tyto vedlejší řetězce k mikrotubulům vážou proteiny stabilizující centrioly, neboť inhibice navázáním specifických protilátek na polyglutamylované

vedlejší řetězce vede k destabilizaci centriol a postupnému rozpadu celé struktury centrosomu (Bobinnec *et al.*, 1998). Polyglutamylované mikrotubuly se dále vyskytují v axonemech bičíků a cilií a bazálních tělískách [Bré *et al.*, 1994; Lehtreck and Geimer, 2000]. Dělicí vřeténka podléhají polyglutamylaci také (Kann *et al.*, 2003). Polyglycinové vedlejší řetězce obsahují 3-34 glycinů (Redeker *et al.*, 1994) a vyskytují se především v axonemech bičíků a cilií (Bré *et al.*, 1996).



Obrázek č. 4: Připojování Glu (A) a Gly (B) podjednotek ke glutamátu na C-terminálním konci $\alpha\beta$ -tubulinu. Převzato z (Garnham and Roll-Mecak, 2012).

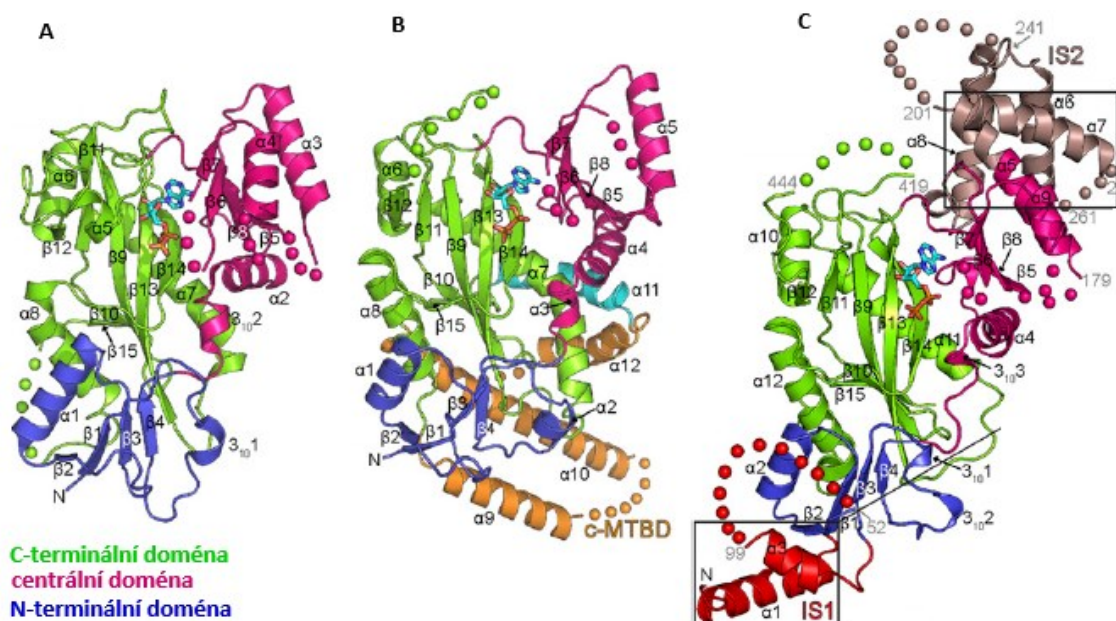
Enzymy katalyzující tyto reakce patří do skupiny Tubulin tyrosine-like ligas (TTLL), protože obsahují homologní domény s TTL enzymy (Janke *et al.*, 2005). Savčích TTLL je celkem 13 a dělí se na specifické glutamylasy a glycylysy [van Dijk *et al.*, 2007; Ikegami *et al.*, 2008]. Odštěpení glutamátu z vedlejšího řetězce katalyzují deglutamylasy – cytosolické karboxypeptidasy (CCP) (Kimura *et al.*, 2010).

3.2.1 Enzymy účastnící se poly-/de-glutamylace a polyglycylyce

Připojení kyseliny glutamové a glycinu k C-koncům $\alpha\beta$ -tubulinu katalyzují glutamylasy a glycylysy patřící do skupiny Tubulin tyrosine-like ligas (TTLL). Doposud je známo 13 savčích TTLL. Mezi glutamylasy patří TTLL1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, a 13 [Janke *et al.*, 2005; van Dijk *et al.*, 2007], kdežto TTLL3, 8 a 10 jsou glycylysy [Ikegami and Setou, 2009; Rogowski *et al.*, 2009]. Dále se glutamylasy odlišují v tom, že TTLL1, 5, 6, 11 a 13 preferenčně modifikují α -tubulin, avšak substrátem pro TTLL4 a 7 je spíše β -tubulin. Pokud ovšem dojde k nad-expresi enzymů, tak množství z nich je schopno modifikovat α i β -tubulin (Janke *et al.*, 2005). Polymerační reakce zahrnuje dva kroky – iniciaci a elongaci. Nejprve se při iniciaci naváže první Glu/Gly, a poté se v rámci elongace mohou připojit další Glu/Gly. Některé glutamylasy a glycylysy katalyzují iniciaci, jiné elongaci a podle toho se dělí na iniciasy (TTLL3, 4, 5, 7 a 8) a elongasy

(TTLL6, 10, 11 a 13). Pro elongasy je předchozí aktivita inicias nezbytná [van Dijk *et al.*, 2007; Ikegami and Setou, 2009; Rogowski *et al.*, 2009]. TTLL10 je jediná známá savčí glycylassa s elongační aktivitou, u lidí však došlo ke ztrátě elongační aktivity zřejmě v důsledku inaktivačních mutací v genu pro TTLL10 (Rogowski *et al.*, 2009). TTLL ale zřejmě nemusí mít vždy striktně elongační nebo iniciační aktivitu. Například TTLL7 je nejspíše iniciasa i elongasa (Mukai *et al.*, 2009). Funkce savčích TTLL2, 9 a 12 není úplně jasná. TTLL2 a 9 postrádají podobně jako TTLL1 (Janke *et al.*, 2005) ve své struktuře domény důležité pro autonomní aktivitu. Jejich enzymatická aktivita je tak pravděpodobně možná jen v komplexu s dalšími proteiny. Studie, při kterých byl gen pro TTLL9 inaktivován ukazují, že TTLL9 je nejspíše α -tubulinová elongasa [Wloga *et al.*, 2008; Konno *et al.*, 2016]. TTLL12 zdá se nekatalyzuje ani glutamylaci, ani glycyllaci zřejmě proto, že jí v TTL doméně chybí aminokyseliny nezbytné pro tuto enzymatickou aktivitu. Role TTLL12 by mohla být spíše regulační (Wasylyk *et al.*, 2010).

Prostorová struktura je známá pro lidskou glutamylasu TTLL7 a glycylassu TTLL3 z *Xenopus tropicalis*. TTLL7 je prvním enzymem ze skupiny, u kterého byla krystalová struktura objasněna. Již dříve bylo jasné, že TTLL obsahují shodné katalytické jádro s TTL složené z N-terminální, centrální a C-terminální domény (obrázek č. 5A). Výrazný rozdíl je v tom, že substrátem TTL je spíše samotný heterodimer, kdežto pro TTLL jsou substrátem mikrotubuly. TTLL7 má ve své struktuře navíc kladně nabitou doménu vázající mikrotubuly (c-MTBD) (obrázek č. 5B). Katalytické jádro TTLL7 rozpoznává C-konce α a β -tubulinu, které pocházejí z rozdílných heterodimerů vyskytujících se za sebou v protofilamentu. c-MTBD interaguje svou N-terminální oblastí s C-koncem helixu H12 a svou C-terminální oblastí s N-koncem helixu H12 protomeru α -tubulinu. Díky této interakci mezi c-MTBD a α -tubulinem je C-konec β -tubulinu lokalizován do aktivního místa. Aktivní místo TTLL7 je otevřenější a tvárnější než u TTL, protože TTLL7 katalyzuje nejen iniciaci, ale i elongaci polyglutamylace, zatímco TTL katalyzuje pouze připojení tyrosinu (Garnham *et al.*, 2015). TTLL3 neobsahuje na rozdíl od TTLL7 c-MTBD, ale má ve své struktuře specifické prvky IS1 a IS2 (obrázek č. 5C). IS1 se skládá ze dvou helixů, které jsou vloženy do N-terminální domény. IS2 je úsek 138 aminokyselin a je součástí centrální domény. IS1 i IS2 jsou prvky nezbytné pro glycyllační aktivitu TTLL3 (Garnham *et al.*, 2017).



Obrázek č. 5: Porovnání krystalových struktur TTL (A), TTLL7 (B) a TTLL3 (C). Ve struktuře TTLL7 se nachází kladně nabitá doména vázající mikrotubuly (c-MTBD), díky jejíž interakci s α -tubulinem se C-konec β -tubulinu dostává do katalytického místa. TTLL3 obsahuje navíc specifické prvky IS1 a IS2 nezbytné pro glycylační aktivitu. Převzato z (Garnham *et al.*, 2017).

Polyglutamylace a polyglycylace jsou modifikace, které se navzájem ovlivňují (Redeker *et al.*, 2005). Snížení tubulinových glycyací vede k tubulinovým hyperglutamylacím a naopak. Při inaktivaci TTLL3 bylo totiž v cílích pozorováno snížení množství glycyací při současném zvýšení počtu glutamylací (Wloga *et al.*, 2009). To je nejspíše způsobeno tím, že se iniciační vazebná místa glutamylas (TTLL7) a glycylas (TTLL3) na C-konci β -tubulinu překrývají. Jako glycylační místa β -tubulinu byla pro TTLL3 identifikována E441 (jako hlavní glycylační místo), E438, E442 a E439. Glutamylačními místy na β -tubulinu jsou pak pro TTLL7 E443, E442, E434 a E441. TTLL3 pravděpodobně soupeří s TTLL7 o své hlavní glycylační místo (E441) (Garnham *et al.*, 2017).

Odštěpení glutamátu katalyzují cytosolické karboxypeptidasy (CCP). Jsou to enzymy patřící zřejmě do skupiny metalokarboxypeptidas (Kalinina *et al.*, 2007). Některé z nich (CCP1,4,5,6) katalyzují odstranění předposledního glutamátu, který je geneticky kódovaný v tubulinu, a tím vzniká $\Delta 2$ tubulin. Současně jsou to ale také deglutamylasy, které jsou schopné zkracovat (CCP1,4,5,6) i úplně odstranit (CCP1 a CCP5) polyglutamátové vedlejší řetězce z $\alpha\beta$ -tubulinu. Zdá se, že mají také svou substrátovou specifitu. CCP1 zkracuje polyglutamátové řetězce, ale je schopná je úplně odstranit jen v případě, že byly vytvořeny katalytickou aktivitou TTLL6. Pokud se na tvorbě vedlejšího řetězce podílí TTLL4, tak CCP1 není schopna katalyzovat deglutamylaci. To

by mohlo být zapříčiněno tím, že substrátem pro TTLL6 je α -tubulin, zatímco TTLL4 preferuje spíše β -tubulin (Rogowski *et al.*, 2010). CCP5 ovšem katalyzuje deglutamylaci α i β -tubulinu a také je schopna odštěpit z α -tubulinu oba glutamáty geneticky kódované na C-konci a vytvořit tak $\Delta 3$ tubulin (Berezniuk *et al.*, 2013). Savčí deglycylasy naopak známé nejsou. Doposud byly objeveny pouze dva enzymy s deglycylační aktivitou u *Giardia duodenalis* (Lalle *et al.*, 2011).

3.2.2 Funkce polyglutamylace a polyglycylace $\alpha\beta$ -tubulinu

Polyglutamylace a polyglycylace jsou klíčové modifikace mikrotubulů v axonemech bičíků a cilií. Obě tyto modifikace jsou součástí stabilních struktur mikrotubulů, což dokazuje i fakt, že se polyglutamylované mikrotubuly v hojné míře vyskytují v neuronech stejně jako $\Delta 2$ tubulin. Dále polyglutamylace ovlivňuje činnost MAP, molekulárních motorů a proteinů štěpících mikrotubuly.

Ukázalo se, že polyglutamylace jako taková a také délka připojeného postranního řetězce ovlivňuje afinitu proteinů interagujících s mikrotubuly, konkrétně kinesinu, MAP1A, MAP1B, MAP2 a také Tau proteinu. Zatímco pro optimální interakci mezi mikrotubuly a kinesinem, MAP1B, MAP2 a tau proteinem jsou potřebné krátké vedlejší řetězce o délce nejvíce tří glutamátů, tak MAP1A vyžaduje pro interakce s mikrotubuly delší polyglutamátové řetězce [Boucher *et al.*, 1994; Larcher *et al.*, 1996; Bonnet *et al.*, 2001]. Podle toho, jakou mikrotubuly zastávají v buňce funkci, mohou díky různě dlouhým polyglutamátovým vedlejším řetězcům interagovat s konkrétními proteiny. Polyglutamylace mikrotubulů je také nezbytná pro správnou funkci kataninu a spastinu, což jsou proteiny štěpící mikrotubuly [Sharma *et al.*, 2007; Roll-Mecak and Vale, 2008].

Funkce polyglutamylasy a polyglycylasy byla studována jejich inaktivací v myších modelech. Polyglutamylasa TTLL1, je proteinový komplex obsahující i nekatalytickou podjednotku PGs1 (polyglutamylase subunit 1) (Regnard, 2003), kódovanou genem *Gtrge022*. Při mutaci tohoto genu u myši dochází ke ztrátě funkční PGs1. Tyto myši jsou životaschopné, ale samci jsou sterilní, kvůli strukturnímu a funkčnímu poškození axonemů bičíků. U těchto myši také dochází k redukci tělesného tuku a změně v chování, konkrétně je pozorována jejich snížená agresivita (Campbell *et al.*, 2002). Dále u nich dochází k výraznému úbytku polyglutamylovaného α -tubulinu v neuronech, což má vliv na snižující se vazbu některých MAP a molekulárních motorů na mikrotubuly. Současně dochází i k velkému poklesu množství synaptických vezikulů (Ikegami *et al.*, 2007). Při

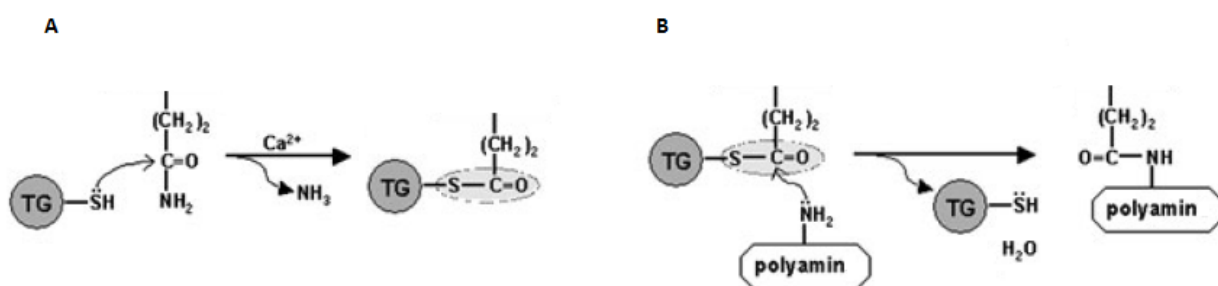
celkové inaktivaci TTLL1 u myši se Ikegami *et al.* zaměřili na cilie z epiteliálních buněk průdušnice, protože obsahují četné polyglutamylace mikrotubulů. Axonemy izolované z cilií byly často rovné nebo měly snížené množství ohybů, což způsobilo ztrátu pohybu, který je nezbytný pro průtok vzduchu. To zapříčinilo kašlání a kýchání kvůli hromadění hlenu v nosní dutině. Polyglutamylace na mikrotubulech axonemů tedy přispívají k zakřivení cilií a jejich správné funkci (Ikegami *et al.*, 2010).

TTLL3 byla zkoumána v souvislosti s kolorektálním karcinomem, protože je to jediná glycyasa vyskytující se v tračniku tlustého střeva. Snížená exprese TTLL3 se v myších modelech tumorigeneze skutečně ukázala jako možná příčina rozvoje nádorů. To pravděpodobně souvisí s nalezením primárních cilií v epiteliálních buňkách tračniku. Primární cilie je senzorická organela obsahující receptory pro růstové faktory a receptory morfogenních proteinů. U buněk se vyskytuje jen přechodně v G₁/G₀ a na počátku S fáze buněčného cyklu a podílí se na regulaci buněčného dělení. Pro správnou funkci cilií je nezbytná glycyace jejich axonemů. Pokud je glycyace narušena inaktivací TTLL3, dojde k destabilizaci primární cilie a zvyšuje se rychlost buněčné proliferace. Ve zdravém tračniku je toto kompenzováno rychlejší obnovou tkáně. V myších modelech tumorigeneze však dochází k rychlému rozvoji nádorů. Glycyace jsou tedy nezbytné pro správnou funkci primárních cilií a buněčnou proliferaci epiteliálních buněk tračniku a nedostatek TTLL3 se tak nejspíše podílí na rozvoji rakoviny tlustého střeva (Rocha *et al.*, 2014).

3.3 Polyaminace $\alpha\beta$ -tubulinu

Polyaminace je esenciální post-translační modifikace pro mikrotubuly v nervových buňkách. Dlouho nebylo jasné, proč jsou mikrotubuly v axonech stabilnější než mikrotubuly v non-neurálních buňkách, u kterých ve většině případů dochází k depolymeraci vlivem chladu, působením Ca²⁺ nebo antimitotických látek [Brady, Tytell and Lasek, 1984; Sahenk and Brady, 1987]. Tato neobvyklá stabilita je způsobena právě polyaminací tubulinu. Dále je tato post-translační modifikace nezbytná pro diferenciaci neuronů při růstu a myelinizaci neuritů. K polyaminaci dochází na α i β -tubulinu a reakce je katalyzována transglutaminasou 2 (TG2), která patří do skupiny transglutaminas (Song *et al.*, 2013). Transglutaminasy jsou Ca²⁺-dependentní acyltransferasy katalyzující vznik kovalentní ϵ -(γ -glytamyl) isopeptidové vazby mezi amino skupinou postranního řetězce lysinu na jednom proteinu a karboxylamidovou skupinou glutaminu na druhém proteinu

(Pisano, Finlayson and Peyton, 1968). Místo lysinu mohou s γ -karboxamidovou skupinou glutaminu v přítomnosti transglutaminasy reagovat i polyaminy a diaminy, jako jsou spermin, spermidin a putrescin, za vzniku γ -glutamyl amidových vazeb (Folk *et al.*, 1980). To vede k produkci nerozpustných makromolekulárních komplexů. V prvním reakčním kroku dochází ke vzniku thioesterové vazby mezi γ -karboxamidovou skupinou glutaminu a cysteinem transglutaminasy (obrázek č. 6A). Tento intermediát poté reaguje s ϵ -aminoskupinou lysinu nebo s polyaminem (obrázek č. 6B). Pokud polyamin není k dispozici, reaguje intermediát s molekulou vody a dochází k deamidaci (Porta *et al.*, 1991).

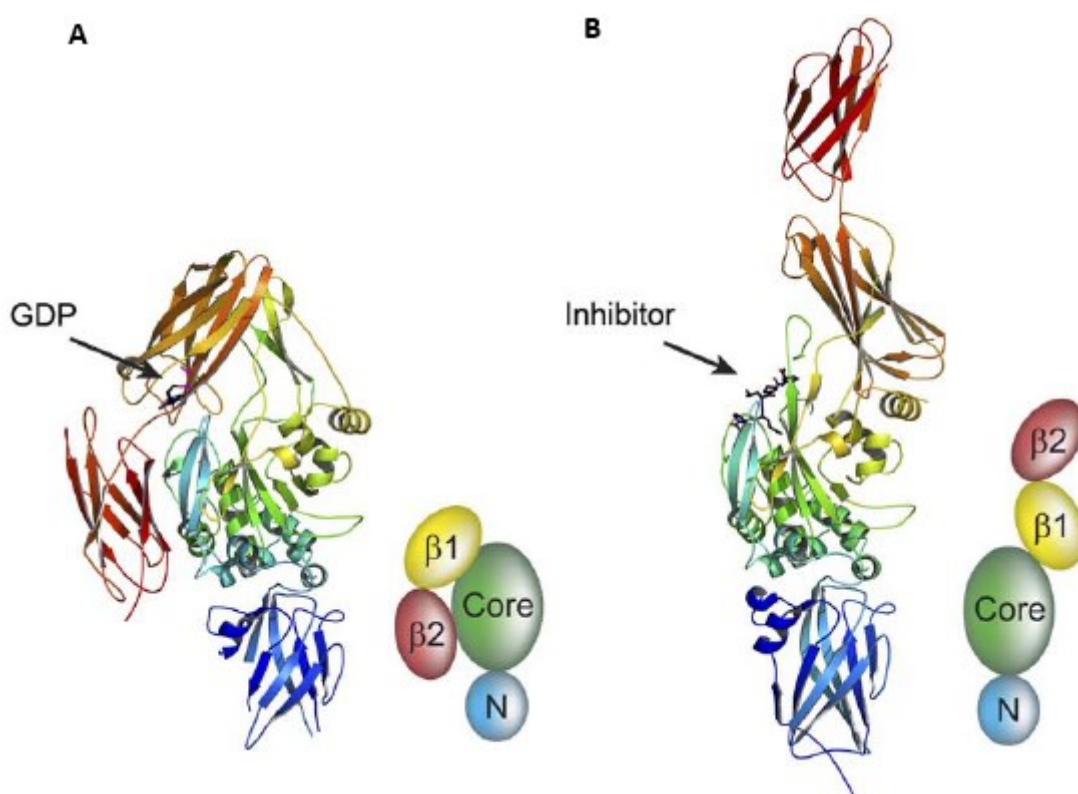


Obrázek č. 6: Mechanismus polyaminace katalyzované TG2. V prvním kroku reakce thiolová skupina TG2 atakuje karbonyl glutaminu a dochází ke vzniku intermediátu. Ve druhém reakčním kroku dochází k vazbě polyaminu a regeneraci TG2. Převzato z (Esposito and Caputo, 2005).

3.3.1 Transglutaminasa 2 (TG2)

Transglutaminasy se nacházejí v extracelulárním i intracelulárním prostoru. TG2 se kromě stabilizace mikrotubulů podílí na stabilizaci extracelulární matrix a jejím hlavním extracelulárním substrátem je fibronectin (Jones *et al.*, 1997). Také mnoho buněčných typů exprimuje TG2, například buňky endotelu a hladkého svalstva, dále mesangiální buňky ledvin, renomedulární intersticiální buňky, epitel thymu, perikryptální fibroblasty tračníku, neurony a další [Thomazy and Fesus, 1989; Appelt *et al.*, 1996]. Kromě transglutaminační aktivity funguje TG2 jako GTPasa (Lee, Birckbichler and Patterson, 1989). Takže stejně jako G-proteiny hydrolyzuje GTP, i když její vazebné místo pro GTP je jiné než u klasických G-proteinů (Liu, Cerione and Clardy, 2002). Aktivita TG2 závisí na lokalizaci v buňce. TG2 v cytosolu má vyšší transglutaminační aktivitu než membránová TG2, která naopak funguje hlavně jako GTPasa (Park *et al.*, 2001). Zaznamenána byla i kinasová aktivita TG2 při fosforylaci IGFBP-3 (insulin-like growth factor-binding protein-3) na membráně buněk rakoviny prsu (Mishra and Murphy, 2004).

TG2 se skládá ze čtyř odlišných domén. Konkrétně z N-terminální domény obsahující β -sandwich, dále z katalytického jádra a dvou C-terminálních domén složených z β -barelů (obrázek č. 7). Katalytické jádro je vazebným místem pro Ca^{2+} , a zde také dochází k transamidaci. Aktivní místo enzymu obsahuje katalytickou triádu Cys277-His335-Asp358, kdy Cys277 je právě nezbytným nukleofilem pro reakci (Liu, Cerione and Clardy, 2002).



Obrázek č. 7: Struktura komplexu TG2 s GDP (A) v porovnání se strukturou komplexu TG2 s inhibítozem napodobujícím substrát (B). TG2 je ve zcela odlišné konformaci s odkrytým katalytickým místem. N-terminální doména je zbarvena modře, katalytické jádro je zelené a C-terminální domény složené z β -barelů mají žlutou a červenou barvu. Převzato z (Pinkas *et al.*, 2007).

Liu, Cerione and Clardy vyřešili krystalovou strukturu TG2 v komplexu s GDP, při jehož vazbě dochází k inhibici enzymové aktivity. Studie z roku 2007 zabývající se také řešením krystalové struktury TG2 použila inhibitor podobný TG2 substrátu a zjistila, že konformace tohoto komplexu se výrazně liší od komplexu TG2 s GDP (obrázek č. 7). Katalytický Cys277 je umístěn v hydrofobním kanálu obklopený Trp241 a Trp332. Inhibitor, napodobující potenciální substrát, je navázán na jedné straně kanálu aktivního

místa, přičemž druhá strana je otevřená a zřejmě slouží k rozpoznání a vazbě substrátu (Pinkas *et al.*, 2007).

Při identifikaci polyaminačních míst ve struktuře $\alpha\beta$ -tubulinu byl pomocí TG2 modifikován tubulin *in vitro*, který byl dále podroben analýze prostřednictvím kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Pro reakci byly použity polyaminy, které se běžně účastní buněčného metabolismu (putrescin, spermin a spermidin). Přepokládaná reakční místa jsou Gln v pozici 15 v N-terminální části β -tubulinu a dále Gln31, Gln128, Gln133, Gln256 a Gln285 na povrchu α -tubulinu. Gln15 se vyskytuje v sekvencích β -tubulinu myšího i lidského. Reakční místa na α -tubulinu se ve struktuře mikrotubulu vyskytují mezi sousedními přilehlými heterodimery v protofilamentu a jejich polyaminace by tedy mohla podle předpokladů vést ke stabilizaci mikrotubulů (Song *et al.*, 2013).

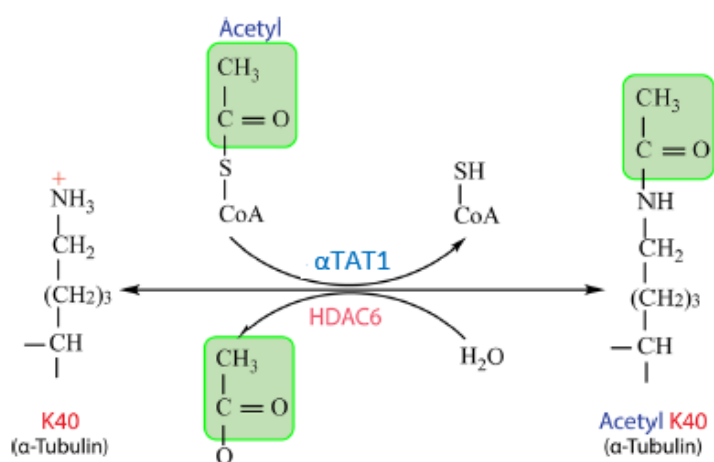
3.3.2 Funkce polyaminace $\alpha\beta$ -tubulinu

Mikrotubuly jsou důležitou součástí buněk nervového systému, kde vykazují neobvyklou stabilitu v porovnání s non-neurálními buňkami. Post-translační inkorporací polyaminu vznikají mikrotubuly stejně odolné a stabilní jako ty v nervových buňkách. Polyaminace je nezbytná při vývoji mozku, podílí se na růstu neuritů, diferenciaci neuronů a myelinizaci axonů. Při vyřazení TG2 u myších modelů docházelo k výraznému poklesu stability mikrotubulů v nervových buňkách. Inhibice syntézy polyaminů měla shodný efekt.

Velmi stabilní struktury ovšem postrádají tvárnost. Plasticita je pro nervové buňky také důležitá, zejména pokud dojde k jejich poškození. Měla by být udržována rovnováha mezi stabilitou a plasticitou, ale během stárnutí hladina polyaminů a aktivita TG2 v mozku stoupá (Song *et al.*, 2013), a to je spojováno s několika neurodegenerativními onemocněními jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc a Huntingtonova choroba (shrnutí v Lesort *et al.*, 2000). Přesto, že TG2 zdá se hraje významnou roli v mnoha buněčných procesech inhibice enzymu u myši nevedla k žádným závažným změnám. To ukazuje na možnost kompenzace ostatními transglutaminázami, které jsou schopné ve většině tkání nahradit katalytickou aktivitu TG2. Za tímto účelem byly zkoumány tkáně v ledvinách, srdci, aortě, játrech, kostech, chrupkách a svalech. Pouze v kosterním svalu nebyla detekována žádná kompenzace inhibované katalytické aktivity TG2 (Deasey, Shanmugasundaram and Nurminskaya, 2013).

3.4 Acetylace α -tubulinu

Acetylace α -tubulinu je dobře známá post-translační modifikace vyskytující se především u stabilních mikrotubulů, které jsou například součástí axonů, bazálních tělísek a axonemů bičíků a cilií. Acetylace α -tubulinu v mikrotubulu spočívá v přenesení acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na ϵ -amino skupinu postranního řetězce lysinu 40 (L'Hernaul and Rosenbaum, 1985). Reakce je reverzibilní a může tedy docházet k hydrolytickému štěpení navázané acetylové skupiny tedy k deacetylaci (obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: Acetylace α -tubulinu je reverzibilní reakce probíhající za účasti enzymů αTAT1 a HDAC6. Převzato z (Li and Yang, 2015).

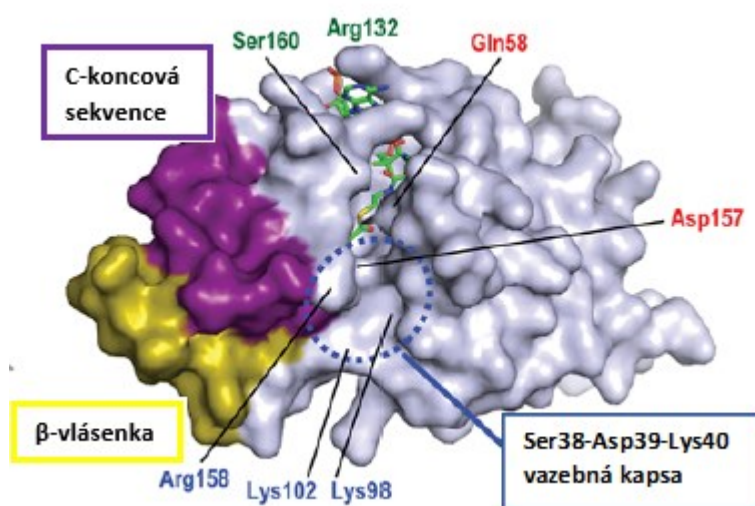
V buňce tyto reakce katalyzují dvě skupiny enzymů, histonacetyltransferasy a histondeacetylasy. Jejich názvy jsou odvozené od histonů, kde byla acetylace na lysinu objevena jako první (Vidali, Gershey and Allfrey, 1968). Mezi nejznámější histonacetyltransferasy patří MEC-17 (mechanosensory abnormality protein 17) (Akella *et al.*, 2010) a její paralog savčí acetyltransferasa αTAT1 (α -tubulin acetyltransferase 1) (Shida *et al.*, 2010). Mezi histondeacetylasy deacetylující α -tubulin, se řadí HDAC6 (histone deacetylase 6) (Hubbert *et al.*, 2002) a SIRT2 (silent information regulator 2). Oba tyto proteiny se nacházejí převážně v cytoplazmě a je možné, že spolu interagují a na deacetylaci se podílejí společně (North *et al.*, 2003).

3.4.1 Tubulinové histonacetyltransferasy a histondeacetylasy

Jako hlavní acetyltransferasy α -tubulinu byly identifikovány MEC-17 (Akella *et al.*, 2010) a její paralog savčí acetyltransferasa αTAT1 (Shida *et al.*, 2010), i když

schopnost acetylovat α -tubulin mají i jiné enzymy jako ELP3 (Elongator complex protein 3) (Creppe *et al.*, 2009) nebo N-acetyltransferasa ARD1-NAT1 (Ohkawa *et al.*, 2008). Prostorová struktura α TAT1 je velmi podobná histonacetyltransferase Gcn5. Zásadní strukturní odlišností je skutečnost, že ve struktuře α TAT1 je širší žlábek pro navázání substrátu a obsahuje prvky specifické pro acetylaci α -tubulinu (Friedmann *et al.*, 2012).

Kromě Lys40 je pro rozpoznání α -tubulinu jako substrátu nezbytný jeho Ser38 a nahrazení alaninem vede k úplné ztrátě acetyltransferasové aktivity. Další důležité aminokyseliny na α -tubulinu účastní se rozpoznávání a jeho vazby s α TAT1 jsou Asp39, Ile42, Gly43-45 a Asp46. Acetylkoenzym A i koenzym A vytvářejí s acetyltransferasou stabilní komplex interakcí s Arg132 a Ser160 a nahrazení alaninem vede ke špatnému sbalení katalytické domény α TAT1. K rozpoznávání substrátu využívá acetyltransferasa specifické oblasti: β -vlásečku (aminokyseliny 104-116) a C-koncovou sekvenci (aminokyseliny 174-194) (obrázek č. 9). Aminokyseliny Asp157, Lys98 a Lys102 jsou také nezbytné pro acetyltransferasovou aktivitu ve vazebném místě pro Lys40, kdežto Arg158 zdá se nehraje důležitou roli. Gln58 interaguje s acetylkoenzymem A a jeho substituce kyselinou glutamovou snižuje afinitu α TAT1 k acetylkoenzymu A. Aby mohla ϵ -amino skupina Lys40 provést nukleofilní atak karbonylu je nutná nejdříve její deprotonace, kterou pravděpodobně zajišťuje Glu58 nebo Asp157 (Yuzawa *et al.*, 2015).



Obrázek č. 9: Struktura katalytické domény α TAT1 s navázaným acetylkoenzymem A. Vyznačené oblasti a aminokyseliny jsou nezbytné pro její acetyltransferasovou aktivitu. Převzato z (Yuzawa *et al.*, 2015).

Acetylaci podléhá v menší míře i samotný heterodimer $\alpha\beta$ -tubulinu, ale mikrotubuly jsou pro acetyltransferasy mnohem lepším substrátem. Není známo, jak se acetyltransferasa dostává k Lys40, který se nachází v lumen mikrotubulu. To, že se nejedná o difúzi, podporuje fakt, že acetylace je nezávislá na délce mikrotubulu (Maruta, Greer and Rosenbaum, 1986). Mohla by se zde nacházet určitá homologie mezi tím, jak se do lumen mikrotubulu dostává taxol. Vazebné místo pro molekulu taxolu se také nachází uvnitř mikrotubulu. Tato vazba je omezena pouze difúzí, a ne délkou mikrotubulů, takže vazebné místo je volně přístupné. Existuje několik alternativ, jak se taxol dostává do lumen mikrotubulu. Jednou z možností je průchod molekul přes 17 Å velké póry v protofilamentech. Druhá varianta poukazuje na to, že laterální interakce mezi protofilamenty nejsou silné a dovolují tak nepřetržité „otevírání a zavírání“ mikrotubulů (mikrotubulární „dýchání“) (Díaz, Barasoain and Andreu, 2003). To je podpořeno zjištěním, že mikrotubuly mění počet protofilament v závislosti na vazbě taxolu (Díaz *et al.*, 1998). Přechod α TAT1 do lumen mikrotubulu by tedy mohl být realizován přes tyto přechodné laterální otvory, protože průchod skrz 17Å póry není kvůli velikosti acetyltransferasy možný (Shida *et al.*, 2010).

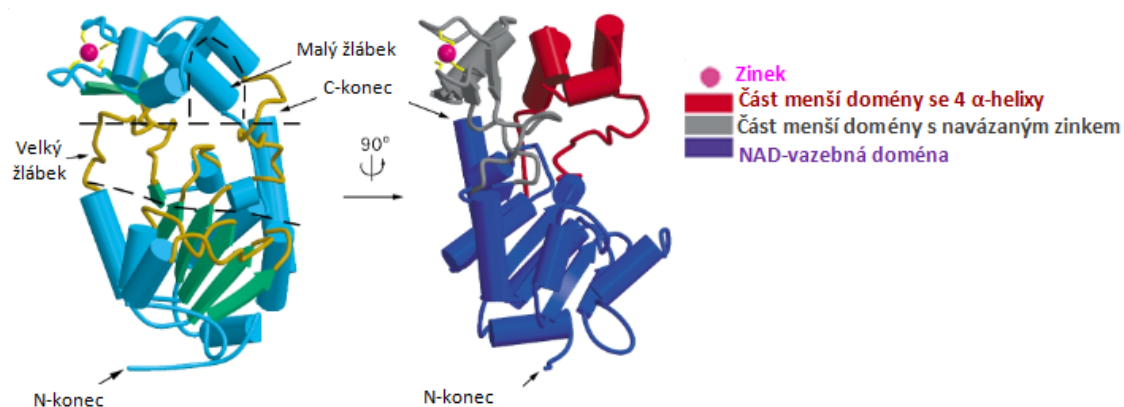
Mezi proteiny schopné deacetylovat α -tubulin se řadí HDAC6 a SIRT2. HDAC6 je Zn^{2+} -dependentní deacetylase vyskytující se převážně v cytoplasmě. Nad-exprese HDAC6 vede k plošné deacetylaci α -tubulinu *in vivo* a naopak při snížení hladiny HDAC6 dochází ke zvýšení množství acetylovaného α -tubulinu. *In vitro* je HDAC6 schopen deacetylovat α -tubulin v mikrotubulech (Hubbert *et al.*, 2002), i když lepším substrátem jsou pro něj samotné heterodimery $\alpha\beta$ -tubulinu (Miyake *et al.*, 2016). HDAC6 se skládá ze dvou tandemových katalytických domén CD1, CD2 (Grozinger, Hassig and Schreiber, 1999) dále pak obsahuje vazebnou doménu pro ubiquitin, která napomáhá transportovat společně s dyneinovými motory špatně sbalené polyubikvitinované proteinové agregáty do aggresomu (Ouyang *et al.*, 2012). Ukotvení v cytoplasmě je zajištěno doménou s opakujícím se serin-glutamátovým motivem (obrázek č. 10) (Bertos *et al.*, 2004).



Obrázek č. 10: Funkční domény lidské HDAC6. NLS = jaderný lokalizační signál; NES = jaderný exportní signál; CD1, DC2 = katalytické domény 1 a 2; SE14 = opakující se serin-glutamátový motiv; ZnF = vazebná doména pro ubiquitin. Převzato z (Hai and Christianson, 2016).

Prostorová struktura tandemových katalytických domén pro lidský HDAC6 bohužel není známá. Je k dispozici pouze krystalová struktura katalytické domény CD2 (Hai and Christianson, 2016). Krystalovou strukturu obou katalytických domén objasňuje studie HDAC6 druhu *Danio rerio*, podle které je katalytická doména CD2 zodpovědná za deacetylaci Lys40 α -tubulinu (Miyake *et al.*, 2016).

SIRT2 je NAD^+ dependentní deacetylase z rodiny sirtuinů, u které byla jako u jediné prokázána deacetylační aktivita na α -tubulinu *in vitro*. *In vivo* byla deacetylase zkoumána také. Eliminace SIRT2 pomocí siRNA vedla podle očekávání k hyperacetylaci α -tubulinu (North *et al.*, 2003). SIRT2 je složený ze dvou domén spojených několika smyčkami, které tak tvoří velký žlábek (obrázek č. 11). Větší NAD -vazebná doména je složená z šesti paralelních β -listů a šesti α -helixů. Obsahuje také typické struktury pro vazbu NAD^+ , jako je sekvence Gly-X-Gly pro vazbu fosfátu, a také struktury pro vazbu dvou ribosových skupin. Menší doména je složená ze dvou částí. Jedna část obsahuje čtyři α -helixy a má hydrofobní vazebnou kapsu, která může rozpoznávat substrát a tvořit tak specifické vazebné místo. Druhá část se skládá ze tří antiparalelních β -listů, α -helixu a obsahuje iont zinku. Katalytickým místem by mohl být velký žlábek, neboť mutace v tomto místě narušují histon-deacetylační aktivitu (Finnin, Donigian and Pavletich, 2001).



Obrázek č. 11: Prostorová struktura SIRT2, který se skládá ze dvou domén spojených několika smyčkami tvořících tak velký a malý žlábek (vlevo). Větší doména vázající NAD^+ je vyznačena tmavě modře, menší doména je složena z části s navázaným zinkem (šedě) a z části s navzájem orientovanými α -helixy (červeně) tak, že tvoří hydrofobní vazebnou kapsu (vlevo). Převzato z (Finnin, Donigian and Pavletich, 2001).

3.4.2 Funkce acetylace tubulinu

Rozsah acetylace tubulinu je různý pro odlišné buňky a tkáně. Míra acetylace je vyšší u postmitotických buněk než u rychle se dělících, protože zde dochází k přestavbě cytoskeletu a struktur složených z mikrotubulů. To souvisí s tím, že acetylovány jsou mikrotubuly stabilních struktur a tubulinové dimery podléhají deacetylaci. Hojně acetylované mikrotubuly obsahují především bazální tělíska a axonemy bičíků a cilií (Piperno, LeDizet and Chang, 1987), a také axony (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1987). Acetylace tedy hraje důležitou roli v buněčné signalizaci, imunitní odpovědi, buněčném pohybu a v interakcích mikrotubulů s proteiny včetně molekulových motorů, jejichž konkrétní příklady jsou uvedeny níže.

Acetylace tubulinu ovlivňuje také signalizaci a imunitní reakce v organismu. Když se makrofágy setkají s bakteriálními lipopolysacharidy (LPS) dojde u nich k rozsáhlé acetylaci tubulinu v mikrotubulech. Pokud je acetylace potlačena inhibicí acetyltransferasy MEC-17 dojde k inhibici produkce protizánětlivého cytokinu interleukinu 10 (IL-10). Naopak pokud jsou mikrotubuly stabilizovány taxolem nebo je deacetylace potlačena inhibicí HDAC6, dochází k zesílené signalizaci prostřednictvím kinasy p38 a zvýšené transkripci IL-10. Inaktivací MEC-17 je signalizace p38 potlačena (Wang *et al.*, 2014). Acetylace se jako post-translační modifikace mikrotubulů také podílí na regulaci interakce mezi proteinem teplotního šoku 90 (Hsp90) a mikrotubuly. α -tubulinová acetylace zvyšuje množství interakcí mezi Hsp90 a mikrotubuly, a to dále stimuluje signální dráhy proteinkinasy B a transkripčního faktoru p53 (Giustiniani *et al.*, 2009). Acetylovaný tubulin se také ukázal jako preferenční místo štěpení mikrotubulů kataninem u fibroblastů a dendritických buněk. Mikrotubuly v neuronech se naopak jako citlivé na katanin neprojeví, což mohlo být způsobeno přítomností proteinu tau (Sudo and Baas, 2010). Deacetylace způsobená HDAC6 nejspíše reguluje buněčný pohyb, protože se ukázalo, že nad-exprese HDAC6 podporuje chemotaktický pohyb buňky (Hubbert *et al.*, 2002). Ztráta acetylace tubulinu také nepříznivě ovlivňuje transport pomocí kinesinu-1 na mikrotubulech *in vitro* (Reed *et al.*, 2006).

Na myších byl zkoumán účinek úplného vyřazení histonacetyltransferas a histondeacetylasy. Myši bez α TAT1 jsou životaschopné. Mají pouze deformovanou část hippocampu, což by mohlo narušovat paměť a učení. Samci jsou méně plodní, protože je u nich pozměněna morfologie bičíků spermií, které nejsou acetylovány (Kim *et al.*, 2013).

Myši postrádající HDAC6 jsou také životaschopné a plodné, jen mají hyperacetylovaný tubulin ve většině tkání. Za normálních okolností se nejvíce HDAC6 tvoří ve varlatech, ale absence HDAC6 nemá na vývoj a funkci tohoto orgánu zdá se vliv. U myši je jen nepatrně negativně ovlivněna imunitní odpověď (Zhang *et al.*, 2008).

3.4.3 Patofyziologie

Acetylace tubulinu je spojována s několika neurodegenerativními onemocněními, rakovinou, a také s několika onemocněními plic a srdce. Mezi neurodegenerativní poruchy způsobené abnormalitami v acetylaci tubulinu patří například Parkinsonova nemoc, Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza. Z nádorových onemocnění jsou to neurofibromatóza 2 typu a rakovina prsu a slinivky břišní (shrnutí v Li and Yang, 2015).

Parkinsonova nemoc je způsobena odumíráním nervových buněk produkujících dopamin ve střední části mozku přesněji v substantia nigra. Je tak narušen přenos signálu mezi nervovými buňkami, což má negativní dopad hlavně na funkce motorické, senzorické a také na funkce limbického systému. Možná genetická příčina tohoto onemocnění je mutace v genu pro LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) (Gilks *et al.*, 2005). Na buněčné úrovni by mohlo být příčinou narušení axonálního transportu zajišťovaného mikrotubuly. Bylo zjištěno, že mutanty LRRK2 mohou přispívat k dynamické nestabilitě mikrotubulů, neboť zapříčiňují hromadění hyperfosforylovaného proteinu tau. LRRK2 se také váže na β -tubulin a inhibuje tak acetylaci α -tubulinu. Mutace R1441G v LRRK2 interakci zeslabuje. Tyto změny na mikrotubulech v nervových buňkách mohou hrát při Parkinsonově nemoci důležitou roli (Law *et al.*, 2014).

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je onemocnění, při kterém dochází k degeneraci motoneuronů předních rohů míšních, motoneuronů hlavových nervů a kortikospinální dráhy. Dědičná forma ALS je pravděpodobně následkem mutace v genu *SOD1* pro superoxiddismutasu 1, a výsledkem je nestabilní enzym s nízkou aktivitou. Kvůli tomu je buňka ve zvýšené míře vystavena oxidativnímu stresu, protože superoxiddismutasa v buňce normálně katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na kyslík nebo peroxid vodíku. Na buněčné úrovni dochází u ALS k poruchám v axonálním transportu. Modelovými organismy pro zkoumání ALS jsou myši s mutací G93A v genu

SOD1. Protože acetylace α -tubulinu napomáhá axonálnímu transportu byla u *SOD1*^{G93A} myši provedena delece genů pro *Hdac6* a *Sirt2*. Ukázalo se, že u *SOD1*^{G93A} myši bez genu pro *Hdac6* nebyl ovlivněn počátek onemocnění, ale díky zvýšené acetylaci α -tubulinu se prodloužila doba života těchto *SOD1*^{G93A} myši a axonální transport zůstal zachován. Delece v genu pro *Sirt2* neměla žádný efekt ani na *SOD1*^{G93A} myši, ani na acetylaci α -tubulinu. Tato zjištění naznačují, že úspěšným cílem pro léčbu ALS by mohl být HDAC6, nikoliv však SIRT2, u kterého byly acetylační schopnosti v buňkách nervového systému zpochybněny (Taes *et al.*, 2013). Určité formy ALS způsobují i mutace v RNA-vazebných proteinech TDP-43 (transactive response DNA binding protein) a FUS (Fused in Sarcoma). Tyto dva proteiny tvoří komplex, který reguluje expresi právě HDAC6. Při ALS se TDP-43 i FUS hromadí v cytosolu degenerovaných neuronů a vytváří agregáty. Pokud je pomocí RNA interference regulován jeden z proteinů TDP-43/FUS dojde k snížení exprese HDAC6 (Kim *et al.*, 2010).

U rakoviny prsu bylo zjištěno, že existuje přímé spojení mezi zvýšenou acetylací α -tubulinu a jejím metastatickým průběhem. Vzorky byly odebrány 144 pacientkám s rakovinou prsu s metastázami v mízních uzlinách. Bylo zjištěno, že u primárního nádoru jsou mikrotubuly acetylovány. Rakovinné buňky metastáz ovšem obsahují vyšší množství acetylovaného tubulinu, které je spojené se zvýšenou migrací buněk. Zamezení této post-translační modifikace mutací v acetylačním místě (K40R) vedla k inhibici migrace, ne však ke snížení proliferace rakovinných buněk. Dále se studie zabývala výskytem α -tubulinových acetylací u basal-like molekulárního subtypu karcinomu prsu. U pacientek s tímto velmi agresivním subtypem rakoviny prsu, který tvoří metastázy a špatně reaguje na léčbu, bylo objeveno zvýšené množství acetylace již v primárním nádoru (Boggs *et al.*, 2015).

4 Další post-translační modifikace

V následujícím textu jsou popisovány modifikace, kterým běžně podléhají proteiny v buňkách, ale na mikrotubulech se nevyskytují v takové míře jako modifikace diskutované výše. Některé se vyskytují jen ve specializovaných buněčných typech nebo byly identifikovány v poslední době a jejich mechanismus a funkce na mikrotubuly nejsou ještě úplně prozkoumány.

Glykosylace a glykace

Glykosylace a glykace tubulinu spočívá v navázání sacharidu přes N/O-glykosidovou vazbu. Rozdíl je v tom, že glykace je reakcí neenzymatickou. Modifikován je α i β -tubulin. K N-glykosylaci tubulinu dochází navázáním sialyloligosacharidů (Hino *et al.*, 2003). U O-glykosylací se jedná o připojení β -N-acetylglukosaminu (GlcNAc), které je často realizováno na serinu (Ser) nebo threoninu (Thr), což jsou současně i reakční místa pro fosforylaci (Liu *et al.*, 2015). Glykosylovaný tubulin nepolymeruje, protože připojení GlcNAc k α -tubulinu znemožňuje tvorbu heterodimerů, které se tak nemohou složit do struktur mikrotubulů (Ji *et al.*, 2011). Ve větší míře je glykosylace pozorována u izotypu III β -tubulinu (TUBB3) (Cicchillitti *et al.*, 2008), který je důležitým ukazatelem rezistence na léky proti rakovině například u pacientů s rakovinou vaječníků (Ferrandina *et al.*, 2006) žaludku (Urano *et al.*, 2006) a prsu (Paradiso *et al.*, 2005). Není ale jasné, jakým způsobem se na rezistenci podílí. Neenzymatická glykace tubulinu nejspíše souvisí s diabetem a může se podílet na vzniku diabetické neuropatie (Cullum *et al.*, 1991).

Fosforylace

Fosforylace je běžná post-translační modifikace mnoha proteinů, při které dochází k připojení fosfátové skupiny nejčastěji na aminokyseliny Tyr, Ser, Thr a His. Reakce je reverzibilní a katalyzují ji proteinkinasy. Opačnou reakcí je defosforylace, která probíhá za účasti fosfatáz. K fosforylaci dochází na Ser, Thr, Tyr α i β tubulinu. Reakce se účastní konkrétně proteinkinasy Syk (spleen tyrosine kinase), Jak2 (Janus kinase 2) a Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1). Syk a Jak2 katalyzují fosforylaci Tyr naopak Cdk1 je Ser/Thr kinasa [Peters *et al.*, 1996; Fourest-Lieuvin, 2005; Ma and Sayeski, 2007].

Syk fosforyluje konkrétně Tyr432 na C-konci α -tubulinu a přesto, že β -tubulin také obsahuje Tyr na svém C-konci fosforylován není. Tyr β -tubulin totiž není obklopen kyselými aminokyselinami, což je nutné pro enzymatickou aktivitu Syk. Fosforylace na C-konci α -tubulinu může ovlivňovat interakce mikrotubulů s MAP (Peters *et al.*, 1996). Pro Jak2 jsou substrátem samostatné heterodimery i mikrotubuly. Fosforylovaný tyrosin tubulinu pravděpodobně interaguje s SH2 doménou transkripčního faktoru STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) a napomáhá jeho transportu do jádra a podílí se tak na Jak2/STAT1 signalizaci (Ma and Sayeski, 2007). Cdk1 reguluje dynamiku mikrotubulů. Katalyzuje fosforylaci Ser172 β -tubulinu během mitózy a

zabraňuje tak polymeraci (Fourest-Lieuvin, 2005). Naopak c-Fes tyrosinová kinasa má na dynamiku mikrotubulů opačný vliv. *In vitro* katalyzuje jejich polymeraci. Tato regulace cytoskeletu vysvětluje zapojení c-Fes v morfologických změnách několika buněčných typů (Laurent *et al.*, 2004). Fosforylace tubulinu/mikrotubulů ovlivňuje jejich dynamiku, podílí se na buněčné signalizaci a také narušuje interakci mikrotubulů s MAP. Zajímavé jsou také poznatky z proteomické studie, která se zaměřila na vyhledání možných reakčních míst pro různé post-translační modifikace na $\alpha\beta$ -tubulinu. Z prostorové struktury α -tubulinu vyplývá, že dvě fosforylační místa Thr80 a Thr94 leží uvnitř mikrotubulu, takže acetylace (methylace) na Lys40 by nemusela být jedinou post-translační modifikací v lumen mikrotubulu (Liu *et al.*, 2015).

Methylace

Při methylaci dochází k připojení methylenové skupiny k tubulinu pomocí methyltransferas. Modifikován je Lys40 α -tubulinu, stejně jako při acetylaci. Reakci katalyzuje methyltransferasa SETD2 (SET domain containing 2), což je enzym zodpovědný současně i za methylaci histonů. A stejně jako u histonů dochází u tubulinu k trimethylaci, kdy jsou navázány 3 methyly. *In vitro* je substrátem pro SETD2 samostatný heterodimer i mikrotubuly. Methylace v buňkách probíhá během mitosy a cytokineze, a při delecii SETD2 je inhibována. To má za následek vady dělicího vřeténka, polyploidii a tvorbu mikronukleí. Acetylace a methylace tedy kompetují o shodné vazebné místo na α -tubulinu a stejně je tomu i u histonů. Acetylace histonu H3 transkripci aktivuje na rozdíl od trimethylace, která na shodném vazebném místě histonu H3 transkripci potlačuje. Analogicky je tedy možné, že trimethylace tubulinu přispívá k depolymeraci mikrotubulů (Park *et al.*, 2016), protože acetylace je spojena s tvorbou stabilních struktur mikrotubulů v nervových buňkách i axonech bičíků a cilií. Během mitosy je naopak důležité, aby mikrotubuly byly dynamické, neboť dochází k jejich výrazné přestavbě.

Palmitoylace

Mikrotubuly interagují a asociují s buněčnými membránami pomocí hydrofobních interakcí například prostřednictvím palmitoylace (Ozols and Caron, 1997). Jedná se o post-translační modifikaci, při které dochází k reverzibilnímu navázání zbytku kyseliny palmitové. V mikrotubulech je hlavním reakčním místem Cys376 α -tubulinu a palmitoylace může probíhat na samostatných heterodimerech i na mikrotubulech

(Ozols and Caron, 1997). β -tubulin v menší míře podléhá této modifikaci také (Zambito and Wolff, 1997). Reakce probíhá za účasti enzymů ze skupiny palmitoyltransferas, které obsahují DHHC katalytickou doménu (Asp-His-His-Cys) [Bartels *et al.*, 1999; Fukata and Fukata, 2010]. Palmitoylace přitom není omezena jen na mikrotubuly v blízkosti membrán. Mutace v Cys377 α -tubulinu nahrazením serinem (C377S) u *Saccharomyces cerevisiae* způsobila pokles palmytoilace o 60 %. Během mitosy byly dále objeveny defekty v organizaci astrálních mikrotubulů, což ovlivnilo nukleární migraci během M fáze buněčného cyklu (Caron *et al.*, 2001).

Sukcinylace

Při sukcinylaci dochází k reakci mezi fumarátem a thiolovou skupinou cysteinu za vzniku S-(2-sukcinyl)cysteinu (2SC). Fumarát v buňce vzniká při metabolismu jako intermediát Krebsova cyklu (Alderson *et al.*, 2006). Sukcinylace tubulinu byla prokázána v myších adipocytech *in vivo* a v tubulinu z mozku prasete, který byl použit pro *in vitro* analýzy. Modifikovány byly Cys347 a Cys376 α -tubulinu a Cys12 a Cys303 β -tubulinu. Tato post-translační modifikace může měnit dynamiku mikrotubulů inhibicí jejich polymerace, a také nejspíše inhibuje proteinové interakce s tubulinem (Piroli *et al.*, 2014).

Ubiquitinace a Sumoylace

Proteiny ubiquitin a SUMO (small ubiquitin-related modifier) jsou malé molekuly, které jsou při post-translačních modifikacích reverzibilně připojovány k proteinovým substrátům pomocí specifických ligas. Dochází přitom k tvorbě isopeptidové vazby mezi glycinem ubiquitinu/SUMO a lysinem proteinového substrátu. Reakce je reverzibilní a SUMO i ubiquitin mohou být odštěpeny pomocí proteas. Ubiquitinace zastává v buňce důležité regulační funkce a je realizována pomocí tří enzymů E1 (aktivační enzym), E2 (konjugační enzym) a E3 (ubiquitin – ligáza). Tyto enzymy katalyzují mono- nebo poly-ubiquitinace. Polyubiquitinace slouží v buňce hlavně k degradaci proteinů v proteazomu. Monoubiquitinace hrají roli při endocytóze, transkripci a opravách DNA [Dover *et al.*, 2002; Dhananjayan, Ismail and Nawaz, 2005; Mukhopadhyay and Riezman, 2007]. Sumoylace na rozdíl od polyubiquitinace nevede k degradaci proteinů, ale ovlivňuje například enzymovou aktivitu, signalizaci, interakci proteinů s DNA a vede spíše ke stabilizaci proteinů (shrnutí v Schwartz and Hochstrasser, 2003). Substrátem pro sumoylaci je α i β -tubulin (Rosas-Acosta *et al.*, 2005), avšak zatím není známo jakým způsobem tato modifikace ovlivňuje funkce

mikrotubulů a jejich dynamiku. Ubiquitinace α -tubulinu zřejmě ovlivňuje dynamiku skládání mikrotubulů v bičíku *Chlamydomonas reinhardtii* (Huang, Diener and Rosenbaum, 2009). Ubiquitínovaný $\alpha\beta$ -tubulin se také ve zvýšené míře vyskytuje při autozomálně recesivně dědičné formě Parkinsonovy nemoci, kdy mutace v genu pro E3 způsobuje zvýšenou ubiquitinaci a degradaci heterodimerů (Ren, Zhao and Feng, 2003).

5 Závěr

V této bakalářské práci jsou shrnuty současné znalosti o post-translačních modifikacích tubulinu včetně zúčastněných enzymů a známých reakčních mechanismů. Dále je diskutován vliv takto modifikovaných mikrotubulů na biologické funkce.

Přiřazení konkrétní buněčné funkce ke specifické post-translační modifikaci je však velmi obtížné vzhledem k tomu, že se na mikrotubulu vyskytuje v různých částech více modifikací najednou a jejich reakční místa na heterodimerech $\alpha\beta$ -tubulinu se často překrývají. Stejně tak určení konkrétního enzymu, který za modifikaci zodpovídá není lehké. Od identifikace deetyrosinace jako post-translační modifikace tubulinu uplynulo více než čtyřicet let, enzym zodpovědný za tuto reakci byl nalezen teprve v roce 2017. Modifikace jsou také rozdílné v konkrétních buněčných typech, a mění se v průběhu buněčného cyklu, diferenciaci a v patologických stavech, jako jsou například tumorigeneze a neurodegenerace. Je nutné odhalit detailní mechanismy, jakými konkrétní enzymy reagují s $\alpha\beta$ -tubulinem a toho je pak možné využít při regulaci daných post-translačních modifikací v patologických stavech, například pomocí specifických inhibitorů příslušných enzymů.

I když můžeme s určitostí říci, že tubulin v mikrotubulech podléhá celkem dvanácti post-translačním modifikacím, tak nevíme, zda je toto číslo konečné. A je velice pravděpodobné, že v následujících letech budou identifikovány další modifikace.

6 Přehled použité literatury

- Aillaud, C. *et al.* (2017) 'Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation', *Science*, 358(6369), pp. 1448–1453. doi: 10.1126/science.aao4165.
- Akella, J. S. *et al.* (2010) 'MEC-17 is an α -tubulin acetyltransferase', *Nature*, 467(7312), pp. 218–222. doi: 10.1038/nature09324.
- Akhmanova, A. and Maiato, H. (2017) 'Closing the tubulin detyrosination cycle', *Science*, pp. 1381–1382. doi: 10.1126/science.aar3895.
- Alderson, N. L. *et al.* (2006) 'S-(2-Succinyl)cysteine: A novel chemical modification of tissue proteins by a Krebs cycle intermediate', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 450(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.abb.2006.03.005.
- Appelt, D. M. *et al.* (1996) 'Localization of transglutaminase in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease', *J. Histochem. Cytochem*, 44(12), pp. 1421–1427. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985134>.
- Arce, C. A. *et al.* (1975) 'Tentative identification of the amino acid that binds tyrosine as a single unit into a soluble brain protein', *FEBS Letters*, 50(1), pp. 5–7. doi: 10.1016/0014-5793(75)81027-1.
- Arce, C. A. *et al.* (1978) 'Capability of tubulin and microtubules to incorporate and to release tyrosine and phenylalanine and the effect of the incorporation of these amino acids on tubulin assembly', *Journal of Neurochemistry*, 31(1), pp. 205–210. doi: 10.1111/j.1471-4159.1978.tb12449.x.
- Arce, C. a and Barra, H. S. (1985) 'Release of C-terminal tyrosine from tubulin and microtubules at steady state.', *The Biochemical journal*, 226(1), pp. 311–317.
- Argaraña, C. E. *et al.* (1977) 'In vivo incorporation of [^{14}C]tyrosine into the C-terminal position of the α subunit of tubulin', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 180(2), pp. 264–268. doi: 10.1016/0003-9861(77)90037-6.
- Audebert, S. *et al.* (1993) 'Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons.', *Molecular biology of the cell*, 4(June), pp. 615–626. doi: 10.1091/mbc.4.6.615.
- Barra, H. S. *et al.* (1973) 'A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins [^{14}C]arginine by a ribonuclease-sensitive system and [^{14}C]tyrosine by a ribonuclease-insensitive system', *Journal of Neurochemistry*, 20(1), pp. 97–108. doi: 10.1111/j.1471-4159.1973.tb12108.x.
- Bartels, D. J. *et al.* (1999) 'Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Molecular and cellular biology*, 19(10), pp. 6775–87. doi: 10.1128/MCB.19.10.6775.

- Belmont, L. D. and Mitchison, T. J. (1996) 'Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules', *Cell*, 84(4), pp. 623–631. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81037-5.
- Berezniuk, I. *et al.* (2012) 'Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing α - and β -tubulin', *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), pp. 6503–6517. doi: 10.1074/jbc.M111.309138.
- Berezniuk, I. *et al.* (2013) 'Cytosolic carboxypeptidase 5 removes α - And β -linked glutamates from tubulin', *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), pp. 30445–30453. doi: 10.1074/jbc.M113.497917.
- Bertos, N. R. *et al.* (2004) 'Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention', *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp. 48246–48254. doi: 10.1074/jbc.M408583200.
- Bieling, P. *et al.* (2008) 'CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulinbinding sites', *Journal of Cell Biology*, 183(7), pp. 1223–1233. doi: 10.1083/jcb.200809190.
- Bobinnec, Y. *et al.* (1998) 'Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells', *Journal of Cell Biology*, 143(6), pp. 1575–1589. doi: 10.1083/jcb.143.6.1575.
- Boggs, A. E. *et al.* (2015) ' α -Tubulin acetylation elevated in metastatic and basal-like breast cancer cells promotes microtentacle formation, adhesion, and invasive migration', *Cancer Research*, 75(1), pp. 203–215. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3563.
- Bonnet, C. *et al.* (2001) 'Differential Binding Regulation of Microtubule-associated Proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by Tubulin Polyglutamylation', *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp. 12839–12848. doi: 10.1074/jbc.M011380200.
- Boucher, D. *et al.* (1994) 'Polyglutamylation of Tubulin as a Progressive Regulator of in Vitro Interactions between the Microtubule-Associated Protein Tau and Tubulin', *Biochemistry*, 33(41), pp. 12471–12477. doi: 10.1021/bi00207a014.
- Brady, S. T., Tytell, M. and Lasek, R. J. (1984) 'Axonal tubulin and axonal microtubules: Biochemical evidence for cold stability', *Journal of Cell Biology*, 99(5), pp. 1716–1724. doi: 10.1083/jcb.99.5.1716.
- Bré, M. H. *et al.* (1994) 'Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 27(4), pp. 337–349. doi: 10.1002/cm.970270406.
- Bré, M. H. *et al.* (1996) 'Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility.', *Journal of cell science*, 109 (Pt 4, pp. 727–738.

- Cambray-Deakin, M. A. and Burgoyne, R. D. (1987) 'Posttranslational modifications of α -tubulin: Acetylated and detyrosinated forms in axons of rat cerebellum', *Journal of Cell Biology*, 104(6), pp. 1569–1574. doi: 10.1083/jcb.104.6.1569.
- Campbell, P. K. *et al.* (2002) 'Mutation of a novel gene results in abnormal development of spermatid flagella, loss of intermale aggression and reduced body fat in mice', *Genetics*, 162(1), pp. 307–320.
- Caron, J. M. *et al.* (2001) 'Single site alpha-tubulin mutation affects astral microtubules and nuclear positioning during anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*: possible role for palmitoylation of alpha-tubulin.', *Molecular biology of the cell*, 12(9), pp. 2672–2687. doi: 10.1091/mbc.12.9.2672.
- Cicchillitti, L. *et al.* (2008) 'Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III α -tubulin', *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), pp. 2070–2079. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2370.
- Creppe, C. *et al.* (2009) 'Elongator Controls the Migration and Differentiation of Cortical Neurons through Acetylation of α -Tubulin', *Cell*, 136(3), pp. 551–564. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.043.
- Cullum, N. A. *et al.* (1991) 'Glycation of rat sciatic nerve tubulin in experimental diabetes mellitus', *Diabetologia*, 34(6), pp. 387–389. doi: 10.1007/BF00403175.
- Deasey, S., Shanmugasundaram, S. and Nurminskaya, M. (2013) 'Tissue-specific responses to loss of transglutaminase 2', *Amino Acids*, 44(1), pp. 179–187. doi: 10.1007/s00726-011-1183-9.
- Dhananjayan, S. C., Ismail, A. and Nawaz, Z. (2005) 'Ubiquitin and control of transcription.', *Essays in biochemistry*, 41, pp. 69–80. doi: 10.1042/EB0410069.
- Díaz, J. F. *et al.* (1998) 'Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to an easily accessible site: Internal microtubule dynamics', *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), pp. 33803–33810. doi: 10.1074/jbc.273.50.33803.
- Díaz, J. F., Barasoain, I. and Andreu, J. M. (2003) 'Fast kinetics of Taxol binding to microtubules: Effects of solution variables and microtubule-associated proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp. 8407–8419. doi: 10.1074/jbc.M211163200.
- van Dijk, J. *et al.* (2007) 'A Targeted Multienzyme Mechanism for Selective Microtubule Polyglutamylation', *Molecular Cell*, 26(3), pp. 437–448. doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.012.
- Dover, J. *et al.* (2002) 'Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6', *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), pp. 28368–28371. doi: 10.1074/jbc.C200348200.
- Dunn, S. *et al.* (2008) 'Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells', *Journal of Cell Science*, 121(7), pp. 1085–1095. doi: 10.1242/jcs.026492.

- Eddé, B. *et al.* (1990) 'Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin.', *Science*, 247(4938), pp. 83–85. doi: 10.1126/science.1967194.
- Erck, C. *et al.* (2005) 'A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), pp. 7853–7858. doi: 10.1073/pnas.0409626102.
- Esposito, C. and Caputo, I. (2005) 'Mammalian transglutaminases: Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance', *FEBS Journal*, pp. 615–631. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04476.x.
- Ferrandina, G. *et al.* (2006) 'Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients', *Clin Cancer Res*, 12(9), pp. 2774–2779. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2715.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R. and Pavletich, N. P. (2001) 'Structure of the histone deacetylase SIRT2', *Nature Structural Biology*, 8(7), pp. 621–625. doi: 10.1038/89668.
- Folk, J. E. *et al.* (1980) 'Polyamines as physiological substrates for transglutaminases.', *Journal of Biological Chemistry*, 255(8), pp. 3695–3700.
- Fourest-Lieuvin, A. (2005) 'Microtubule Regulation in Mitosis: Tubulin Phosphorylation by the Cyclin-dependent Kinase Cdk1', *Molecular Biology of the Cell*, 17(3), pp. 1041–1050. doi: 10.1091/mbc.E05-07-0621.
- Friedmann, D. R. *et al.* (2012) 'Structure of the α -tubulin acetyltransferase, TAT1, and implications for tubulin-specific acetylation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48), pp. 19655–19660. doi: 10.1073/pnas.1209357109.
- Fukata, Y. and Fukata, M. (2010) 'Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity', *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 161–175. doi: 10.1038/nrn2788.
- Galperin, M. Y. and Koonin, E. V. (2008) 'A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity', *Protein Science*, 17(12), pp. 2639–2643. doi: 10.1002/pro.5560061218.
- Garnham, C. P. *et al.* (2015) 'Multivalent microtubule recognition by tubulin tyrosine ligase-like family glutamylases', *Cell*, 161(5), pp. 1112–1123. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.003.
- Garnham, C. P. *et al.* (2017) 'Crystal structure of tubulin tyrosine ligase-like 3 reveals essential architectural elements unique to tubulin monoglycylases', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(25), pp. 6545–6550. doi: 10.1073/pnas.1617286114.
- Garnham, C. P. and Roll-Mecak, A. (2012) 'The chemical complexity of cellular microtubules: Tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions', *Cytoskeleton*, pp. 442–463. doi: 10.1002/cm.21027.
- Geimer, S. *et al.* (1997) 'Purification and characterization of basal apparatuses from a flagellate green alga', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 37(1), pp. 72–85. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:1<72::AID-CM7>3.0.CO;2-J.

- Gilks, W. P. *et al.* (2005) 'A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease', *Lancet*, 365(9457), pp. 415–416. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17830-1.
- Giustiniani, J. *et al.* (2009) 'Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53', *Cellular Signalling*, 21(4), pp. 529–539. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.12.004.
- Grozinger, C. M., Hassig, C. a and Schreiber, S. L. (1999) 'Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), pp. 4868–4873. doi: 10.1073/pnas.96.9.4868.
- Hai, Y. and Christianson, D. W. (2016) 'Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition', *Nature Chemical Biology*, 12(9), pp. 741–747. doi: 10.1038/nchembio.2134.
- Hino, M. *et al.* (2003) 'Glycosylation of the alpha and beta tubulin by sialyloligosaccharides.', *Zoological science*, 20(6), pp. 709–715. doi: 10.2108/zsj.20.709.
- Huang, K., Diener, D. R. and Rosenbaum, J. L. (2009) 'The ubiquitin conjugation system is involved in the disassembly of cilia and flagella', *Journal of Cell Biology*, 186(4), pp. 601–613. doi: 10.1083/jcb.200903066.
- Hubbert, C. *et al.* (2002) 'HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase', *Nature*, 417(6887), pp. 455–458. doi: 10.1038/417455a.
- Chalfie, M. and Thomson, J. N. (1979) 'Organization of neuronal microtubules in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Journal of Cell Biology*, 82(1), pp. 278–289. doi: 10.1083/jcb.82.1.278.
- Ikegami, K. *et al.* (2007) 'Loss of alpha-tubulin polyglutamylase in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), pp. 3213–3218. doi: 10.1073/pnas.0611547104.
- Ikegami, K. *et al.* (2008) 'TTLL10 is a protein polyglycylase that can modify nucleosome assembly protein 1', *FEBS Letters*, 582(7), pp. 1129–1134. doi: 10.1016/j.febslet.2008.02.079.
- Ikegami, K. *et al.* (2010) 'Tubulin polyglutamylase is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), pp. 10490–10495. doi: 10.1073/pnas.1002128107.
- Ikegami, K. and Setou, M. (2009) 'TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8', *FEBS Letters*, 583(12), pp. 1957–1963. doi: 10.1016/j.febslet.2009.05.003.
- Janke, C. *et al.* (2005) 'Biochemistry: Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family', *Science*, 308(5729), pp. 1758–1762. doi: 10.1126/science.1113010.
- Ji, S. *et al.* (2011) 'O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization', *Amino Acids*, 40(3), pp. 809–818. doi: 10.1007/s00726-010-0698-9.

- Jones, R. a *et al.* (1997) 'Reduced expression of tissue transglutaminase in a human endothelial cell line leads to changes in cell spreading, cell adhesion and reduced polymerisation of fibronectin.', *Journal of cell science*, 110 (Pt 1, pp. 2461–2472.
- Jordan, M. A. and Wilson, L. (2004) 'Microtubules as a Target for Anticancer Drugs', *Nat. Rev. Cancer.*, 4(4), pp. 253–265. doi: 10.1038/nr1317.
- Kalinina, E. *et al.* (2007) 'A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases.', *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(3), pp. 836–850. doi: 10.1096/fj.06-7329com.
- Kann, M. L. *et al.* (2003) 'Glutamylated tubulin: Diversity of expression and distribution of isoforms', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 55(1), pp. 14–25. doi: 10.1002/cm.10107.
- Kim, G. W. *et al.* (2013) 'Mice lacking alpha-tubulin acetyltransferase 1 are viable but display alpha-tubulin acetylation deficiency and dentate gyrus distortion', *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), pp. 20334–20350. doi: 10.1074/jbc.M113.464792.
- Kim, S. H. *et al.* (2010) 'Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA', *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), pp. 34097–34105. doi: 10.1074/jbc.M110.154831.
- Kimura, Y. *et al.* (2010) 'Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs)', *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), pp. 22936–22941. doi: 10.1074/jbc.C110.128280.
- Konishi, Y. and Setou, M. (2009) 'Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons', *Nature Neuroscience*, 12(5), pp. 559–567. doi: 10.1038/nn.2314.
- Konno, A. *et al.* (2016) 'Ttl9^{-/-} mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylation and a stall in beating.', *Journal of cell science*, 129(14), pp. 2757–66. doi: 10.1242/jcs.185983.
- Konno, A., Setou, M. and Ikegami, K. (2012) 'Ciliary and Flagellar Structure and Function-Their Regulations by Posttranslational Modifications of Axonemal Tubulin', *International Review of Cell and Molecular Biology*, 294, pp. 133–170. doi: 10.1016/B978-0-12-394305-7.00003-3.
- Kreitzer, G., Liao, G. and Gundersen, G. G. (1999) 'Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism.', *Molecular biology of the cell*, 10(April), pp. 1105–1118. doi: PMC25238.
- Lafanechère, L. *et al.* (1998) 'Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth.', *Journal of cell science*, 111, pp. 171–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405300>.
- Lalle, M. *et al.* (2011) 'Giardia duodenalis 14-3-3 protein is polyglycylated by a tubulin tyrosine ligase-like member and deglycylated by two metallocarboxypeptidases', *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), pp. 4471–4484. doi: 10.1074/jbc.M110.181511.

- Larcher, J. C. *et al.* (1996) 'Interaction of kinesin motor domains with α - and β -tubulin subunits at a tau-independent binding site: Regulation by polyglutamylation', *Journal of Biological Chemistry*, 271(36), pp. 22117–22124. doi: 10.1074/jbc.271.36.22117.
- Laurent, C. E. *et al.* (2004) 'The human c-Fes tyrosine kinase binds tubulin and microtubules through separate domains and promotes microtubule assembly.', *Molecular and cellular biology*, 24(21), pp. 9351–9358. doi: 10.1128/MCB.24.21.9351-9358.2004.
- Law, B. M. H. *et al.* (2014) 'A direct interaction between leucine-rich repeat kinase 2 and specific β -Tubulin isoforms regulates tubulin acetylation', *Journal of Biological Chemistry*, 289(2), pp. 895–908. doi: 10.1074/jbc.M113.507913.
- Lee, K. N., Birckbichler, P. J. and Patterson, M. K. (1989) 'GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 162(3), pp. 1370–1375. doi: 10.1016/0006-291X(89)90825-5.
- Lehtreck, K. F. and Geimer, S. (2000) 'Distribution of polyglutamylated tubulin in the flagellar apparatus of green flagellates', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 47(3), pp. 219–235. doi: 10.1002/1097-0169(200011)47:3<219::AID-CM5>3.0.CO;2-Q.
- Lesort, M. *et al.* (2000) 'Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases', *Progress in Neurobiology*, 61(5), pp. 439–463. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00052-0).
- Li, L. and Yang, X. J. (2015) 'Tubulin acetylation: Responsible enzymes, biological functions and human diseases', *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 4237–4255. doi: 10.1007/s00018-015-2000-5.
- Liao, G. and Gundersen, G. G. (1998) 'Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments: Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin', *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), pp. 9797–9803. doi: 10.1074/jbc.273.16.9797.
- Liu, N. *et al.* (2015) 'Proteomic Profiling and Functional Characterization of Multiple Post-Translational Modifications of Tubulin', *Journal of Proteome Research*, 14(8), pp. 3292–3304. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00308.
- Liu, S., Cerione, R. a and Clardy, J. (2002) 'Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), pp. 2743–2747. doi: 10.1073/pnas.042454899.
- Ma, X. and Sayeski, P. P. (2007) 'Identification of tubulin as a substrate of Jak2 tyrosine kinase and its role in Jak2-dependent signaling', *Biochemistry*, 46(24), pp. 7153–7162. doi: 10.1021/bi700101n.
- MacRae, T. H. (1997) 'Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action.', *European journal of biochemistry / FEBS*, 244(2), pp. 265–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118990>.

- Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (1995) 'Microtubules and microtubule-associated proteins', *Current Opinion in Cell Biology*, 7(1), pp. 72–81. doi: 10.1016/0955-0674(95)80047-6.
- Marcos, S. *et al.* (2009) 'Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone', *PLoS ONE*, 4(4). doi: 10.1371/journal.pone.0005405.
- Maruta, H., Greer, K. and Rosenbaum, J. L. (1986) 'The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules', *Journal of Cell Biology*, 103(2), pp. 571–579. doi: 10.1083/jcb.103.2.571.
- McKenney, R. J. *et al.* (2016) 'Tyrosination of α -tubulin controls the initiation of processive dynein–dynactin motility', *The EMBO Journal*, 35(11), pp. 1175–1185. doi: 10.15252/embj.201593071.
- Mialhe, A. *et al.* (2001) 'Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis', *Cancer Research*, 61(13), pp. 5024–5027. doi: 11431336.
- Mishra, S. and Murphy, L. J. (2004) 'Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity. Identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), pp. 23863–23868. doi: 10.1074/jbc.M311919200.
- Miyake, Y. *et al.* (2016) 'Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition', *Nature Chemical Biology*, 12(9), pp. 748–754. doi: 10.1038/nchembio.2140.
- Mukai, M. *et al.* (2009) 'Recombinant mammalian Tubulin polyglutamylase TTL7 performs both initiation and elongation of polyglutamylation on β -Tubulin through a random sequential pathway', *Biochemistry*, 48(5), pp. 1084–1093. doi: 10.1021/bi802047y.
- Mukhopadhyay, D. and Riezman, H. (2007) 'Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling', *Science*, pp. 201–205. doi: 10.1126/science.1127085.
- Nieuwenhuis, J. *et al.* (2017) 'Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity', *Science*, 358(6369), pp. 1453–1456. doi: 10.1126/science.aao5676.
- North, B. J. *et al.* (2003) 'The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase', *Molecular Cell*, 11(2), pp. 437–444. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00038-8.
- Ohkawa, N. *et al.* (2008) 'N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development', *Genes to Cells*, 13(11), pp. 1171–1183. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01235.x.
- Ouyang, H. *et al.* (2012) 'Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini', *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), pp. 2317–2327. doi: 10.1074/jbc.M111.273730.
- Ozols, J. and Caron, J. M. (1997) 'Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation.', *Molecular biology of the cell*, 8(April), pp. 637–645. doi: 10.1091/mbc.8.4.637.

- Paradiso, A. *et al.* (2005) 'Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer', *Annals of Oncology*, 16(SUPPL. 4). doi: 10.1093/annonc/mdi902.
- Park, H. *et al.* (2001) 'Distinct characteristic of Gah(transglutaminase II) by compartment: GTPase and transglutaminase activities', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(2), pp. 496–500. doi: 10.1006/bbrc.2001.4997.
- Park, I. Y. *et al.* (2016) 'Dual Chromatin and Cytoskeletal Remodeling by SETD2', *Cell*, 166(4), pp. 950–962. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.005.
- Paturle-Lafanechère, L. *et al.* (1991) 'Characterization of a Major Brain Tubulin Variant Which Cannot Be Tyrosinated', *Biochemistry*, 30(43), pp. 10523–10528. doi: 10.1021/bi00107a022.
- Paturle-Lafanechère, L. *et al.* (1994) 'Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies', *J. Cell Sci.*, 107 (Pt 6, pp. 1529–1543. doi: 10.1016/0309-1651(82)90164-3.
- Peris, L. *et al.* (2006) 'Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends', *Journal of Cell Biology*, 174(6), pp. 839–849. doi: 10.1083/jcb.200512058.
- Peters, J. D. *et al.* (1996) 'Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates α -tubulin on tyrosine', *Journal of Biological Chemistry*, 271(9), pp. 4755–4762. doi: 10.1074/jbc.271.9.4755.
- Pinkas, D. M. *et al.* (2007) 'Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation', *PLoS Biology*, 5(12), pp. 2788–2796. doi: 10.1371/journal.pbio.0050327.
- Piperno, G., LeDizet, M. and Chang, X. J. (1987) 'Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture.', *Journal of Cell Biology*, 104(2), pp. 289–302. doi: 10.1083/jcb.104.2.289.
- Pirolì, G. G. *et al.* (2014) 'Identification of protein succination as a novel modification of tubulin', *Biochemical Journal*, 462(2), pp. 231–245. doi: 10.1042/BJ20131581.
- Pisano, J. J., Finlayson, J. S. and Peyton, M. P. (1968) 'Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine.', *Science (New York, N.Y.)*, 160(3830), pp. 892–893. doi: 10.1126/science.160.3830.892.
- Porta, R. *et al.* (1991) 'Mass Spectre-metric Identification of the Amino Donor and Acceptor Sites in a Transglutaminase Protein Substrate Secreted from Rat Seminal Vesicles', *Biochemistry*, 30(12), pp. 3114–3120. doi: 10.1021/bi00226a019.
- Prota, A. E. *et al.* (2013) 'Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase', *Journal of Cell Biology*, 200(3), pp. 259–270. doi: 10.1083/jcb.201211017.
- Redeker, V. *et al.* (1991) 'Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to α -tubulin', *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), pp. 23461–23466. doi: 10.1007/BF01673740.

- Redeker, V. *et al.* (1994) 'Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules.', *Science*, 266(1993), pp. 1688–1691. doi: 10.1126/science.7992051.
- Redeker, V. *et al.* (2005) 'Mutations of tubulin glycylation sites reveal cross-talk between the C termini of α - and β -tubulin and affect the ciliary matrix in *Tetrahymena*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), pp. 596–606. doi: 10.1074/jbc.M408324200.
- Reed, N. A. *et al.* (2006) 'Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport', *Current Biology*, 16(21), pp. 2166–2172. doi: 10.1016/j.cub.2006.09.014.
- Regnard, C. (2003) 'Characterisation of PGs1, a subunit of a protein complex co-purifying with tubulin polyglutamylase', *Journal of Cell Science*, 116(20), pp. 4181–4190. doi: 10.1242/jcs.00743.
- Ren, Y., Zhao, J. and Feng, J. (2003) 'Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp. 3316–24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3316-03.2003.
- Rogowski, K. *et al.* (2009) 'Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation', *Cell*, 137(6), pp. 1076–1087. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.020.
- Rogowski, K. *et al.* (2010) 'A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration', *Cell*, 143(4), pp. 564–578. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.014.
- Rocha, C. *et al.* (2014) 'Tubulin glycylation is required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon.', *The EMBO journal*, 33(19), pp. 1–14. doi: 10.15252/embj.201488466.
- Roll-Mecak, A. and Vale, R. D. (2008) 'Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin', *Nature*, 451(7176), pp. 363–367. doi: 10.1038/nature06482.
- Rosas-Acosta, G. *et al.* (2005) 'A Universal Strategy for Proteomic Studies of SUMO and Other Ubiquitin-like Modifiers', *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(1), pp. 56–72. doi: 10.1074/mcp.M400149-MCP200.
- Sahenk, Z. and Brady, S. T. (1987) 'Axonal tubulin and microtubules: morphologic evidence for stable regions on axonal microtubules.', *Cell motility and the cytoskeleton*, 8(2), pp. 155–164. doi: 10.1002/cm.970080207.
- Sanchez-Pulido, L. and Ponting, C. P. (2016) 'Vasohibins: New transglutaminase-like cysteine proteases possessing a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad', *Bioinformatics*, 32(10), pp. 1441–1445. doi: 10.1093/bioinformatics/btv761.
- Sharma, N. *et al.* (2007) 'Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia', *Journal of Cell Biology*, 178(6), pp. 1065–1079. doi: 10.1083/jcb.200704021.
- Shida, T. *et al.* (2010) 'The major β -tubulin K40 acetyltransferase TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), pp. 21517–21522. doi: 10.1073/pnas.1013728107.

- Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M. (2003) 'A superfamily of protein tags: Ubiquitin, SUMO and related modifiers', *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 321–328. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00113-0.
- Song, Y. *et al.* (2013) 'Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules', *Neuron*, 78(1), pp. 109–123. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.036.
- Song, Y. and Brady, S. T. (2015) 'Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules', *Trends in Cell Biology*, pp. 125–136. doi: 10.1016/j.tcb.2014.10.004.
- Soucek, K. *et al.* (2006) 'Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of alpha-tubulin posttranslational modifications', *Prostate*, 66(9), pp. 954–965. doi: 10.1002/pros.20416.
- Sudo, H. and Baas, P. W. (2010) 'Acetylation of Microtubules Influences Their Sensitivity to Severing by Katanin in Neurons and Fibroblasts', *Journal of Neuroscience*, 30(21), pp. 7215–7226. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0048-10.2010.
- Sullivan, K. F. and Cleveland, D. W. (1986) 'Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12), pp. 4327–4331. doi: 10.1073/pnas.83.12.4327.
- Suzuki, Y. *et al.* (2010) 'Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion.', *Journal of cell science*, 123(Pt 18), pp. 3094–101. doi: 10.1242/jcs.067538.
- Szyk, A. *et al.* (2011) 'Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin', *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(11), pp. 1250–1258. doi: 10.1038/nsmb.2148.
- Taes, I. *et al.* (2013) 'Hdac6 deletion delays disease progression in the *sod1g93a* mouse model of ALS', *Human Molecular Genetics*, 22(9), pp. 1783–1790. doi: 10.1093/hmg/ddt028.
- Thomazy, V. and Fesus, L. (1989) 'Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study.', *Cell Tissue Res*, 255, pp. 215–224. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2567625>.
- Tort, O. *et al.* (2014) 'The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids', *Molecular Biology of the Cell*, 25(19), pp. 3017–3027. doi: 10.1091/mbc.E14-06-1072.
- Tucker, J. B. *et al.* (1992) 'A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea.', *J Cell Sci*, 102 (Pt 2, pp. 215–226.
- Urano, N. *et al.* (2006) 'Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer.', *International journal of oncology*, 28(2), pp. 375–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391792>.

- Vidali, G., Gershey, E. L. and Allfrey, V. G. (1968) 'Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones.', *Journal of Biological Chemistry*, 243(24), pp. 6361–6366.
- Wang, B. *et al.* (2014) 'Microtubule acetylation amplifies p38 kinase signalling and anti-inflammatory IL-10 production', *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms4479.
- Wasylyk, C. *et al.* (2010) 'Tubulin tyrosine ligase like 12 links to prostate cancer through tubulin posttranslational modification and chromosome ploidy', *International Journal of Cancer*, 127(11), pp. 2542–2553. doi: 10.1002/ijc.25261.
- Weake, V. M. and Workman, J. L. (2008) 'Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity', *Molecular Cell*, pp. 653–663. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.014.
- Webster, D. R. *et al.* (1987) 'Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), pp. 9040–9044. doi: 10.1073/pnas.84.24.9040.
- Wloga, D. *et al.* (2008) 'Glutamylation on α -tubulin is not essential but affects the assembly and functions of a subset of microtubules in *Tetrahymena thermophila*', *Eukaryotic Cell*, 7(8), pp. 1362–1372. doi: 10.1128/EC.00084-08.
- Wloga, D. *et al.* (2009) 'TTLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia', *Developmental Cell*, 16(6), pp. 867–876. doi: 10.1016/j.devcel.2009.04.008.
- Yuzawa, S. *et al.* (2015) 'Structural basis of cofactor-mediated stabilization and substrate recognition of the α -tubulin acetyltransferase α TAT1.', *The Biochemical journal*, 467(1), pp. 103–113. doi: 10.1042/BJ20141193.
- Zambito, A. M. and Wolff, J. (1997) 'Palmitoylation of tubulin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(3), pp. 650–654. doi: 10.1006/bbrc.1997.7525.
- Zhang, Y. *et al.* (2008) 'Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally', *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), pp. 1688–1701. doi: 10.1128/MCB.01154-06.